

• 综 述 •

基于信号通路的中药有效成分治疗骨质疏松机制研究进展

赵金龙^{1,2}, 曾令烽^{2,3}, 梁桂洪^{2,3}, 黄和涛^{1,2}, 杨伟毅^{2,3}, 罗明辉^{2,3}, 潘建科^{2,3}, 李嘉晖^{1,2}, 刘 军^{2,3*}

1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510405

2. 广东省中医药科学院, 骨与关节退变及损伤研究团队, 广东 广州 510120

3. 广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院), 广东 广州 510120

摘 要: 骨质疏松是一种全身骨骼疾病, 对患者及社会均产生巨大的医疗负担。药物治疗是抗骨质疏松的主要干预措施, 但客观存在的不良反应降低了患者的服用依从性从而影响用药效果。中医药防治骨质疏松具有较好的疗效以及安全性, 但其作用机制需深入研究。通路调控骨质疏松的进展, 是进行骨质疏松病理机制和药理学研究的主要靶点之一。近几年, 针对中药有效成分对骨质疏松信号通路的调控机制作了大量研究。综述近年来有关中药有效成分干预生物学信号通路的相关研究成果, 为抗骨质疏松症的新药开发、基础研究以及临床应用提供思路。

关键词: 中药; 有效成分; 骨质疏松; 信号通路; 作用机制; 促进骨形成; 抑制骨吸收

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)23-6084-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.23.023

Research progress on mechanism of active components of Chinese materia medica in treatment of osteoporosis based on signaling pathway

ZHAO Jin-long^{1,2}, ZENG Ling-feng^{2,3}, LIANG Gui-hong^{2,3}, HUANG He-tao^{1,2}, YANG Wei-yi^{2,3},
LUO Ming-hui^{2,3}, PAN Jian-ke^{2,3}, LI Jia-hui^{1,2}, LIU Jun^{2,3}

1. The Second School of Clinical Medical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. Research Team on Bone and Joint Degeneration and Injury, Guangdong Academy of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

3. The Second Affiliated Hospital (Guangdong Province Hospital of Traditional Chinese Medicine), Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

Abstract: Osteoporosis is a systemic skeletal disease that causes a huge medical burden on patients and society. Drug treatment is the main intervention for anti-osteoporosis, but objectively existing adverse reactions reduce the patient's compliance and affect the effect of medication. Traditional Chinese medicine has good curative effect and safety in the prevention and treatment of osteoporosis, but its mechanism of action needs to be further studied. The pathway regulates the progress of osteoporosis and is one of the main targets for osteoporosis pathological mechanism and pharmacological research. In recent years, an increasing number of studies have been made on the regulatory mechanism of osteoporosis signaling pathways by active ingredients of Chinese materia medica. Recent research results on the active components of Chinese materia medica interfering with biological signaling pathways was reviewed in this article,

收稿日期: 2020-03-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82004383); 国家自然科学基金资助项目(81974574); 国家自然科学基金资助项目(81473698); 广东省财政厅资助项目([2014]157, [2018]8号); 广东省中医院中医药科学技术研究专项(YN2019ML08, YK2013B2N19, YN2015MS15); 中国博士后科学基金资助项目(2018M633036); 广东省医学科学技术研究基金项目(B2019091, A2017215); 广东省中医药管理局项目(20201129, 20164020, 20181119); 教育部高等学校博士点科研基金项目(20124425110004); 广东省科技计划项目(2020A1414050050); 广东省普通高校重点科研平台和科研项目(2018KQNCX041)

作者简介: 赵金龙(1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中医骨伤科学(骨质疏松、骨关节炎)。

Tel: 18813966364 E-mail: zhaojinlong41@163.com

***通信作者** 刘 军(1966—), 男, 主任中医师, 博士生导师, 研究方向为骨与关节退变及损伤疾病的基础与临床研究。

Tel: (020)81887233-35633 E-mail: liujun.gdcm@hotmail.com

in order to provide ideas for new drug development, basic research, and clinical applications for osteoporosis.

Key words: Chinese materia medica; active components; osteoporosis; signaling pathway; mechanism; promotion of bone formation; inhibition of bone resorption

骨质疏松是一种全身骨骼疾病,其病理特征是骨量低,骨组织微结构恶化,导致脆性增加,骨折风险增加^[1]。流行病学调查显示,中国大于 60 岁人口已超 2.1 亿,65 岁及以上老年人口约有 1.4 亿^[2],是全球老年人口绝对数最大的国家,骨质疏松症是与增龄相关的骨骼疾病,意味着中国患有骨质疏松的人数也将是庞大的。目前常用的治疗骨质疏松的药物主要有双膦酸盐类药物、甲状旁素、选择性雌激素受体调节剂、钙剂等^[3-5]。尽管以上多种常用的西药已经证明有治疗骨质疏松的疗效,但是患者服用药物的依从性仍然是关键问题^[6-7]。患者服用药物的依从性不理想,其中一个重要原因是西药的不良反应^[8]。骨质疏松为中医学中“骨痿”“骨枯”等病证范畴。中药(特别是补肾壮骨类以及含黄酮类活性成分的中药)防治骨质疏松在依从性以及疗效上具有一定的优势^[9]。

探讨骨质疏松症病理进展的分子机制有益于挖掘中药干预骨质疏松的治疗靶点,为中医药防治骨质疏松症提供基础研究和临床治疗的理论根据。骨代谢的平衡状态直接影响骨质疏松症的发生发展,根据骨质疏松的发生机制、基础研究以及临床用药主要以促进骨形成或抑制骨吸收作为主要思路^[10]。因此在分子以及通路层面,中药干预骨质疏松的研究思路主要集中在中药相关活性成分如何通过信号通路维持骨稳态,即破骨细胞以及成骨细胞生物活性的平衡。近年来,针对中药的活性成分对骨质疏松症相关信号通路的调控开展了广泛的基础以及临床研究。本文就中药有效成分对骨质疏松的信号通路研究进展进行综述,希望为基础研究以及临床应用中药治疗骨质疏松症提供研究思路 and 理论根据。

1 Wnt 信号通路

Wnt 信号通路对调控骨骼发育有关键地位,且在调节骨代谢的动态平衡具有重要作用^[11]。Wnt 相关蛋白或因子可与卷曲基因受体(Fzd)进行结合,并激活下游的相关细胞内级联反应,进而调控 β -连环蛋白(β -Catenin)、过氧化物酶增殖物活化受体 γ (PPAR γ)、runt 相关转录因子-2(Runx2)等靶基因的转录或表达,进而调控成骨细胞的生成、分化以及成熟等生理过程^[12-13]。根据 Wnt 信号通路下游激

活条件的需求不同,该通路分为经典信号通路(Wnt/ β -Catenin 通路)和非经典通路(Wnt/ β -Catenin 以外的其他信号通路)^[14-16]。经典通路的相关研究具有较为深入的研究成果,但由于 Wnt 蛋白重组具有较高难度,因此非经典通路未完全阐明。 β -Catenin 是经典通路上的关键因子,对调节 Wnt/ β -Catenin 通路具有关键作用。 β -Catenin 在促成骨的同时,具有提高碱性磷酸(ALP)活性的作用^[17]。Runx2 为成骨细胞的一类特异性转录因子,与成骨细胞的增殖、分化等都具有密切的关系。Lu 等^[18]研究表明,Runx2 的表达减少,可抑制 Wnt/ β -Catenin 通路的活性,对成骨细胞的增殖以及骨形成等产生阻碍。因此 Wnt 信号通路在调控骨平衡状态中具有关键作用。因此中药活性成分通过干预 Wnt 信号通路,对于防治骨质疏松具有巨大的应用潜力。喻琴云等^[19]通过中药活性成分白藜芦醇干预卵巢切除(ovariectomized, OVX)大鼠,观察白藜芦醇对 Wnt/ β -Catenin 通路的影响。研究表明,白藜芦醇通过增加 Runx2 mRNA 以及 β -Catenin mRNA 的表达,降低降解蛋白 GSK-3 β mRNA 的表达,表明白藜芦醇上调 Runx2,提高了 GSK-3 β 磷酸化的程度,进而提高 β -Catenin 的稳定性,使 β -Catenin 聚集、转入细胞核中,从而激活 Wnt/ β -Catenin 信号通路。通过激活该通路,促进了 OVX 大鼠的成骨细胞分化,且 SD 大鼠骨密度(BMD)值的提升表明 OVX 大鼠的骨合成代谢明显增强。在与破骨细胞的活性对比上,白藜芦醇明显提高了成骨细胞的活性,减缓甚至抑制了骨量的丢失,进而发挥抗骨质疏松作用^[19]。李智奎等^[20]通过观察淫羊藿苷调控 Wnt/ β -Catenin 信号通路干预实验鼠骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)的影响,以研究淫羊藿苷对骨质疏松防治的机制。研究结果表明,淫羊藿苷干预 BMSCs 后可以激活 Wnt/ β -Catenin 通路,显著提高 β -Catenin 和 Wnt7 标志蛋白,同时抑制了 GSK-3 β 的表达,且该种机制在低、高浓度(10、40 ng/mL)的淫羊藿苷均能重复。研究表明,淫羊藿苷可激活 Wnt/ β -Catenin 通路,通过抑制 PPAR γ 、脂肪酸结合蛋白 4(FABP4)和降脂素(Adipsin),提高 Runx2、OPN、ALP 的表达,进而促进了大鼠

BMSCs 向成骨分化,即提高了 BMSCs 成骨分化的能力。且其研究证实淫羊藿苷亦通过调控 Wnt/ β -Catenin 通路抑制了 BMSCs 的成脂分化。该实验结果提示淫羊藿苷通过该通路调控 BMSCs 的多向分化,促进成骨分化,抑制成脂分化,这在与破骨细胞的平衡上使得成骨细胞活性占据主导地位,这可能是淫羊藿苷发挥防治骨质疏松维持骨稳态的生物学机制^[20]。张贤等^[21]研究杜仲醇对大鼠 BMSCs 以及 Wnt 信号通路影响,以探讨杜仲醇防治骨质疏松的作用机制。实验表明,杜仲醇通过上调卷曲蛋白 2 (Fzd2)、卷曲蛋白 3 (Fzd3) 和 β -Catenin,同时抑制核内 Wnt 抑制因子 (WIF1) 的表达,说明了杜仲醇通过促进胞膜 Frizzled (Fzd) 相关分子以及 β -Catenin,同时降低了 WIF1 的表达,双向激活了 Wnt 通路,促进骨组织的成骨分化,促进了骨合成的生物学进程,进一步对冲了骨质疏松过程中发生的骨丢失,这可能是杜仲醇发挥抗骨质疏松作用的机制。李家等^[22]也研究了续断皂苷 VI 在 Wnt/ β -Catenin 通路层面防治骨质疏松的分子机制。该研究通过应用续断皂苷 VI 干预小鼠 BMSCs,以观察 Wnt/ β -Catenin 通路相关基因表达的变化。研究表明,续断皂苷 VI 可以提升 OVX 小鼠的股骨 BMD,并且改善骨小梁微结构。其机制可能是续断皂苷 VI 通过增加 β -Catenin、OCN、Runx2 等基因的表达,进而激活 Wnt/ β -Catenin 通路促进 OVX 大鼠 BMSCs 向成骨分化,这一抗骨质疏松的生物学机制与淫羊藿苷调控 Wnt 通路促进成骨分化,抑制成脂分化,进而促进成骨细胞与破骨细胞的骨代谢平衡具有一致性。此外,海参皂苷^[23]、丹参素^[24]、秦皮乙素^[25]、虎杖苷^[26]、黄芪甲苷^[27]、菟丝子黄酮^[28]、淫羊藿苷^[29]、5-羟甲基-2-糠醛^[30]也被证明可以调控 Wnt/ β -Catenin 经典以及非经典通路上的相关基因以及蛋白,进而促进成骨细胞的活性,或抑制破骨细胞的增殖以及 BMSCs 的成脂分化,起到抗骨质疏松的功效。经过文献梳理发现,现有研究的大部分中药有效成分主要通过干预 Wnt 通路提升成骨细胞增殖活性,使得在与破骨细胞的动态平衡中成骨分化增强,进而维护骨稳态。

2 OPG/RANK/RANKL 信号通路

骨保护素 (osteoprotegerin, OPG)-核因子- κ B 受体活化因子 (receptor activator of NF- κ B, RANK)-核因子 κ B 受体活化因子配体 (ligand of receptor activator of NF- κ B, RANKL) 在骨稳态的动态维持

中具有关键作用^[31-32]。现有研究表明破骨细胞前体的分化与成熟均离不开启动因子 RANKL,该启动因子的主要功能是活化破骨细胞的 RANK 受体,从而诱导破骨细胞分化成破骨细胞,调控破骨细胞的生物学进程,有效调控骨代谢^[33-34]。OPG 是活化 RANKL 的最佳因子,通过干预 RANKL 与 RANK 的结合,进而可抑制破骨细胞的成熟分化,可以有效地减少骨吸收^[35]。OPG 和 RANKL 之间的动态平衡调控着骨吸收的程度,因此 OPG/RANKL 的比值是骨稳态的决定因素之一。刘康等^[36]对 OVX 大鼠 ig 骨碎补总黄酮,进而观察骨碎补总黄酮对骨稳态的影响。实验表明,骨碎补总黄酮通过上调 OVX 大鼠上调 OPG 以及雌二醇的表达,同时下调 RANKL 和 RANK,进而起到防治骨质疏松的作用。具体表现为骨碎补总黄酮通过上调成骨细胞的 OPG 活性,抑制 RANKL 的表达进而降低了破骨细胞的活性以及生成,从而降低了破骨细胞的骨吸收作用,促使骨合成功能在骨代谢过程中占据主要地位,这对骨稳态的维持具有决定性作用。张晓燕等^[37]通过丹参素干预 OVX 大鼠,观测到 OVX 大鼠牙槽骨组织的 OPG/RANKL 的比例明显增高,这表明丹参素通过 OPG-RANK-RANKL 通路,抑制了破骨细胞的活性,进一步维护了骨形成与骨吸收的动态平衡,延缓了骨质疏松进展。该实验表明,丹参素通过抑制 OVX 大鼠破骨细胞的增殖活性,减少了骨吸收,延缓了破骨细胞对骨量造成的流失,维护了成骨细胞与破骨细胞活性平衡。另有研究表明,淫羊藿苷可以上调去势骨质疏松症模型大鼠 OPG mRNA 的表达,同时也抑制了 RANKL mRNA 和 RANK mRNA 的活化,并且成骨细胞可旁分泌 OPG 从而促进与 RANKL 竞争性结合,抑制了破骨细胞分化,减缓了骨吸收,对维护成骨细胞与破骨细胞在生物体的动态平衡具有重要作用^[38]。通过对现有中药有效成分调控 OPG/RANK/RANKL 信号通路发挥抗骨质疏松作用的细胞生物学机制,本研究发现骨碎补总黄酮、丹参素、淫羊藿苷等主要是对生物体的破骨细胞增殖活性等进行抑制,进而减少了骨吸收,使得生物体的成骨细胞活性强于或趋同于破骨细胞的生物活性,进而维持了骨稳态。

3 MAPKs 信号通路

丝裂原活化蛋白激酶家族 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 是细胞浆内一种保守的丝氨酸蛋白激酶,是一种传递应激信号以及促进细胞

增殖的蛋白激酶,其在多种细胞因子的信号传导中发挥着重要的介导作用^[39]。MAPKs 家族成员主要有细胞外信号调节蛋白激酶 (ERKs)、c-Jun N 末端蛋白激酶 (JNKs)、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 等,对连接多种细胞表面蛋白以及炎症基因表达具有关键作用^[40]。骨质疏松的相关因子较多,如 RANKL、OPG、PTH、ALP、BMP、TGF- β 等,通过激活相关蛋白因子,可以激活 MAPKs 信号通路,进而起到防治骨质疏松的作用^[41]。李启活^[42]通过在 hFOB1.19 细胞培养基中加入补骨脂素,探讨补骨脂素防治骨质疏松的有关分子机制。研究结果表明,补骨脂素可以上调 p-ERK、GLUT3、p65、p-p38 和 p-JNK 等亚族蛋白,激活 MAPKs 通路,促进成骨细胞的分化以及增殖,相较于破骨细胞活性增强,因此成骨细胞活性趋同或强于破骨细胞活性,从而发挥防治骨质疏松作用^[42]。朱晓峰等^[43]通过骨碎补总黄酮干预 SD 大鼠成骨细胞,研究骨碎补总黄酮抗骨质疏松的分子机制。研究结果表明,骨碎补总黄酮可以促进成骨细胞 ERK1/2 和 p38 的磷酸化,进而激活 MAPKs 相关通路,提高了成骨细胞的分化活性以及其矿化能力,对骨代谢中骨形成与骨吸收的平衡具有关键作用,这是骨碎补总黄酮通过 MAPKs 通路抗骨质疏松的潜在分子机制^[43]。林紫微^[44]应用芍药苷干预由 RAW 264.7 细胞株分化的破骨细胞模型,观测芍药苷在破骨细胞信号通路分子层面的作用。结果提示,芍药苷抑制 p38 MAPK 的磷酸化,即抑制了 MAPKs 信号通路的活化,而 MAPKs 通路是破骨细胞分化的主要通路之一,因此芍药苷可能是通过抑制 p38 MAPK 的磷酸化,进而抑制了 MAPKs 通路的激活,降低了破骨细胞的活性。芍药苷通过 MAPKs 信号通路抑制破骨细胞的活性,降低其骨吸收的速率,使得骨形成与骨吸收的生物学进程趋同或骨形成活性强于骨吸收,达到骨代谢的良性平衡。有实验^[45]采用淫羊藿次苷 II 干预 SD 大鼠成骨细胞以观察淫羊藿次苷 II 在通路层面防治骨质疏松的机制^[45]。结果显示,淫羊藿次苷 II 可以通过上调成骨细胞的 p-p38MAPK、ALP 和 OPG 等蛋白的表达,激活 p38 MAPK 信号通路,促进成骨细胞分化。成骨细胞分化的增强,相较于破骨细胞的活性趋同或更强,是淫羊藿次苷 II 发挥抗骨疏作用的重要机制^[45]。5-羟甲基-2-糠醛^[30]、刺芒柄花素^[46]、三七总皂苷^[47]以及香叶木素^[48]均被验证了其通过 MAPKs 信号通路发

挥抗骨质疏松的潜在分子机制,以上中药有效成分可以通过提高成骨细胞活性,促进骨形成或抑制破骨细胞活性,减少骨吸收,从而达到维护生物体的骨稳态,防治骨质疏松的目的。此外,以上中药有效成分是否可以同时通过 MAPKs 信号通路发挥双向(抑制破骨细胞活性以及增强成骨细胞分化能力)值得进一步探讨。

4 PI3K/Akt 信号通路

磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)-丝氨酸/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路调控者细胞的多种生物代谢过程,是细胞增殖、分化、成熟以及凋亡的关键通路^[49]。PI3K/Akt 信号通路通过激活激酶系统,磷酸化后活化 PI3K/Akt 信号通路调控相关因子,如一氧化氮 (NO) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 等,而 NO 和 VEGF 是血管至关重要的活性因子,具有促进血管新生的作用^[50]。且研究证明,VEGF 可对成骨细胞产生直接作用,可对成骨细胞的增殖具有积极的促进作用^[51]。曾锁林等^[52]通过采用 OVX 大鼠为实验对象,研究葛根素对去卵巢大鼠 PI3K/Akt 信号通路的影响。研究表明,葛根素提高 OVX 大鼠血清中 VEGF 和 NO 的水平,可促进 OVX 大鼠的血管新生,是的骨骼相关血供、血液循环等内环境得以重建,为成骨细胞的增殖提供良好的微环境,这可以促进骨代谢中的骨形成,使得骨形成活性增强成为抗骨质疏松的主要生物学过程,这可能是葛根素的作用的内在机制^[52]。曾锁林等^[52]认为,PI3K/Akt 信号通路促进血管的重建,PI3K 可调节细胞的内环境代谢,并且是通路的传递信使,参与 Akt 相关性通路的活化。Akt 的磷酸化可以促进其调节 VEGF 和 NO 等活性因子,进而发挥其介导细胞生长发育、血管重建等生物过程,这是葛根素通过 PI3K/Akt 信号通路抗骨质疏松作用的潜在机制。现有的研究主要认为葛根素的抗骨质疏松作用主要是为骨骼生长创造良好的血液循环等微环境,进而增强成骨细胞活性、促进骨形成,在干预骨质疏松过程中让骨形成成为主要的生物学活动,以此维持骨稳态^[52]。这是现有研究中较为特殊的研究方向,值得进一步深入验证及研究。

5 BMPs 信号通路

骨形成蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 为一类重要的旁分泌以及自分泌生长因子,源于成骨细胞的分泌合成以及释放,在骨代谢过程中具有关键作用,对骨形成以及骨修复意义深远^[53]。

在经典的 BMP 信号通路中, BMP-2 以及磷酸化受体 Smd1、Smd5 以及 Smd8 结合后在核内聚集, 活化转录与成骨有关的靶点基因^[54]。骨形成蛋白-2 (BMP-2) 可激活或抑制 Runx2 蛋白的表达, 且 BMP-2 激活的 Smads 通过相应的片段结合诱导骨形成特异基因的表达。当 Smads 被负调控, 则会抑制 Smad1、Smad5 的活化以及抑制其在细胞核聚集, 会导致 BMP-2 调控的成骨进程被抑制^[55]。沈智等^[56]研究了骨碎补总黄酮对悬尾雄性实验性骨质疏松模型 SD 大鼠 BMD 和 BMP-2 mRNA 的影响。实验结果表明, 骨碎补总黄酮可上调 BMP-2 mRNA 的表达, 进而激活 BMPs 信号通路, 促进 BMSCs 向成骨细胞分化, 提高废用性骨质疏松 SD 大鼠的骨密度。这一过程主要是骨碎补总黄酮通过调控 BMSCs 的 BMPs 信号通路, 促进 BMSCs 向成骨细胞分化, 促进骨形成, 进而在骨代谢中成为主要的生物学过程, 相较于骨吸收更为活跃, 这是细胞活性层面抗骨质疏松的关键^[56]。有实验研究了淫羊藿苷对 MC3T3-E1 细胞增殖、分化的机制。结果表明, 淫羊藿苷可上调 MC3T3-E1 前体成骨细胞 BMP-2 的表达, 活化 BMP-2/Smads 通路, 进而启动下游成骨基因的表达, 促进细胞增殖分化。当加入 BMP 的抑制剂, 淫羊藿苷对 MC3T3-E1 细胞的 ALP 活性产生了抑制, Smad1/5/8、BMP-2 和 Smad4 等蛋白均受到了抑制, 侧面印证了淫羊藿苷通过 BMPs 通路促进成骨细胞的增殖分化, 促进骨形成, 与骨碎补总黄酮的作用机制具有高度一致性^[57]。

6 NF- κ B 信号通路

NF- κ B 信号通路在骨代谢中具有关键作用, 该通路可与其他信号通路相互影响, 共同影响着骨质疏松的进展。NF- κ B 信号通路的主要由 I κ B 蛋白、核心 I κ B 激酶 (I κ B kinase, IKK) 复合物和 NF- κ B 组成^[58]。I κ B α 蛋白酶体可降解暴露 NF- κ B/p65 亚单位的转位信号, 促进 NF- κ B 进入细胞核内与相关基因结合, 启动这些基因的转录。NF- κ B 通路的活化在胚胎发育期间调节骨代谢, 在某些特定病理条件下对骨骼系统产生影响, 如骨质疏松、骨关节炎等^[59]。林紫微^[44]应用芍药苷干预由 RAW 264.7 细胞株分化的破骨细胞模型, 观测芍药苷对破骨细胞信号通路的影响。结果提示芍药苷弱化了 p65 NF- κ B 的磷酸化水平, 即抑制了 NF- κ B 信号通路的活化。NF- κ B 通路是破骨细胞分化的主要生物学通路之一, 侧面验证了芍药苷通过抑制 p65 NF- κ B 的激活, 降低了

NF- κ B 信号通路的活性, 降低破骨细胞的活性, 减少了骨吸收, 进一步维护了骨稳态。实验研究表明连翘酯苷 A 可抑制 TRAF6 的 Lys63 多聚泛素化, I κ B α 的降解以及 p65NF- κ B 入核抑制了 NF- κ B 信号通路。对 NF- κ B 通路的抑制, 减少骨吸收, 抑制了破骨细胞的生物学活性, 在与成骨细胞的平衡中趋于稳定, 这有利于维持骨稳态^[60]。王礼宁^[61]采用蛇床子素干预破骨细胞, 研究蛇床子素作用于破骨细胞的作用机制。实验结果表明, 蛇床子素通过上调 P65NF- κ B, 下调 NFATc1、CTSK、MMP-9、TRAP 和 p-I κ B 的表达, 抑制 NF- κ B 通路的表达进而抑制破骨细胞的进一步分化, 相较于成骨细胞的活性差距大程度缩小甚至趋同, 这是蛇床子素通过 NF- κ B 通路抗骨质疏松的分子机制。李启活^[42]通过在 hFOB1.19 细胞培养基中加入补骨脂素, 观察补骨脂素对 NF- κ B 通路上的影响。研究结果显示, 补骨脂素可以上调通路上的 p65 以及 GLUT3 蛋白, 促使 IKK 活化进而促进 I κ B 的磷酸化进程, 经过以上反应激活 NF- κ B 信号通路进而介导成骨分化。芍药苷^[44]、蛇床子素^[60]、连翘酯苷 A^[61]和补骨脂素^[42]等中药有效成分对 NF- κ B 信号通路的影响表明, 对该通路的干预既可抑制骨吸收, 也可促进骨形成, 同一种中药有效成分以增强成骨细胞活性为主, 还是以抑制破骨细胞形成为主, 或是可以双向调节, 值得进一步研究与探讨。

7 GABA 信号通路

γ -氨基丁酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA) 信号通路主要是由谷氨酸、GABA、谷氨酸脱羧酶 (GAD)、GABA 受体、GABA-T 等组成, 其中 GABA 是神经系统中含量最丰富, 并且其生理功能最重要的抑制性神经递质^[62]。细胞实验表明, 从颅骨来源的成骨细胞中观测到 γ -氨基丁酸 B 受体 (GABABR) mRNA 以及蛋白表达, GABABR 激动剂可抑制成骨细胞 cAMP 以及 ALP 的活性, 并减少 Ca^{2+} 的内流, 表明 GABA 可以通过 GABABR 影响成骨细胞的代谢, 并对其成骨功能具有重要意义^[62]。另有研究发现 BMSCs 中也存在 GABABR mRNA 表达, 这从多层面证实了成骨细胞表达 GABABR^[63]。这表明 GABA 信号通路上的 GABA 及其受体广泛存在于骨的代谢环境中, 发挥类似于在神经系统中的双向调节作用, 对骨细胞的增殖分化和骨稳态的维护有重要作用。实验表明, 补骨脂二氢黄酮可增加骨质疏松模型大鼠 BMD, 这就降低了成骨细胞的迫切需

求,进而使得中枢系统的调节作用减缓,减少了 GABA 相关物质的释放。并且补骨脂二氢黄酮可以下调骨组织中的 γ -氨基丁酸 B 受体 1 亚型 (GABABRI) 和 GABA,抑制 GABA 信号通路,进而抑制成骨细胞的凋亡。通过减少成骨细胞的凋亡,保证了骨代谢过程中有充足的成骨细胞,在与破骨细胞生物学进程中,可起到抗衡作用,有利于骨形成与骨吸收的动态稳定^[64]。朱振标等^[65]研究了葛根总黄酮对 OVX 大鼠 GABA 信号通路的影响,研究表明,葛根总黄酮可以降低血清中 GAD 的水平,下调骨组织中 GABA、GABABRI mRNA 和 GABABRI 的表达,进而抑制 GABA 信号通路,延缓成骨细胞的凋亡进展,利于维护破骨细胞与成骨细胞的持续性动态平衡。吕辰鹏^[66]研究了骨碎补总黄酮对 OVX 大鼠骨代谢的影响。研究表明骨碎补总黄酮可以降低 OVX 大鼠中血清 GAD 水平,下调 GABA、GABABRI mRNA 和 GABABRI 的表达,其抗骨质疏松的机制与葛根总黄酮类似。这从侧面印证了中药总黄酮类在 GABA 信号通路作用下通过相似的调控机制防治骨质疏松,具体表现为减少或延缓成骨细胞的凋亡。

8 Notch 信号通路

Notch 信号通路由 Notch 受体、Notch 配体和细胞内效应分子 (CBF1/suppressor of hairless/Lag-1, CSL) 组成。Notch 受体为跨膜蛋白,有 4 种不同的受体 (Notch1-4),由胞外区以及胞内区 (Notch intracellular domain, NICD) 组成^[67]。Notch 配体亦是跨膜蛋白,根据同源性划分,共有 5 种配体类型 (JAG1、JAG2、DLL1、DLL3、DLL4)^[68]。相关研究表明,Notch1-2 以及其配体 DLL1、JAG1 在成骨细胞中均有表达,而 Notch3-4 的表达则相对较少^[69]。研究表明,在体外激活 Notch 模型中发现 BMP 活性增加以及新骨形成,这表明 Notch 信号通路的表达影响了成骨分化的进展^[70]。在骨组织中,受体 Notch1 的表达激活可上调 OPG 且抑制硬化蛋白以 Dkk1 的表达,进而活化 Wnt 信号通路且抑制破骨细胞的形成,这对于维持骨稳态是具有生理意义的^[71]。邢贞武^[72]研究了补骨脂素对骨质疏松患者 BMSCs 的影响,并对其分子机制进行了观察。研究表明,补骨脂素可以明显上调 Notch1 受体、Jagged1 配体以及 Hes1 的表达,活化 Notch 通路进而干预 BMSCs,促进 BMSCs 增殖、分化并促使 BMSCs 向成骨分化,促进骨形成,有利于在骨代谢中与骨

吸收进程中维持动态平衡状态。骨碎补总黄酮可以明显提升 SD 大鼠血清中的血钙以及血磷水平,其潜在机制可能是骨碎补总黄酮可以下调 BMSCs 的 Notch-1、Hes-1 mRNA 水平,通过干预 Notch 信号通路起到抗骨质疏松的作用,其对破骨细胞以及成骨细胞的影响有待进一步研究^[73]。孙雪武^[60]通过研究连翘酯苷 A 在 OVX 小鼠 Notch 信号通路的影响发现,连翘酯苷 A 可以下调 NICD 蛋白以及上调 RBPJK 蛋白。抑制 RBPJK 蛋白的表达,可以促进破骨细胞标志蛋白 NFATc1 的表达。上调 RBPJK 蛋白的表达,降低破骨细胞活性,减少骨吸收,维护了破骨细胞与成骨细胞活性的平衡。汪小飞等^[74]研究表明,淫羊藿总黄酮对增龄性骨质疏松性大鼠的骨密度具有提升作用,可以改善其骨代谢状态,其内在机制可能与淫羊藿总黄酮上调 Notch1、Smd4 和 Smd7 等蛋白有一定的联系,但其通过调控 Notch 信号通路进而影响成骨细胞或破骨细胞的生物学机制有待进一步的研究。

9 Hedgehog 信号通路

Hedgehog 通路由 Hedgehog 蛋白、Gli 蛋白、Smoothed (Smo) 特异性抗体、Ptched (Ptc) 以及下游靶基因组成^[75]。现有研究表明,Hedgehog 通路可调控成骨细胞增殖与分化^[76]。动物实验表明 sonic hedgehog (Shh) 可以促进成骨细胞的增殖、分化,其机制是通过上调 Indian hedgehog (Ihh) 实现的^[77]。实验表明,Hedgehog-Ptc1 信号可经由 Gli3 作用于 Runx2 促进小鼠成骨细胞的增殖分化^[76]。韩宇等^[78]研究了补骨脂素介导 Hedgehog 通路促进 BMSCs 的成骨分化机制,实验表明补骨脂素可上调 Shh 和 Gli1,下调 Ptch1 mRNA 及其蛋白的表达,激活 Hedgehog 信号通路,促进大鼠 BMSCs 向成骨分化以及促进成骨细胞增殖,促进骨形成,相较于骨吸收活性增强,是补骨脂发挥维护骨稳态的主要机制。目前中药有效成分作用于 Hedgehog 信号通路,进而防治骨质疏松的种类仍较少,有待进一步深入研究。

10 cAMP/PKA/CREB 信号通路

蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 和激活环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 调控亚基结合,从而促进亚基的活化,具有活性的亚基可入核,调控环磷酸腺苷效应元件结合蛋白家族 (cAMP-response element binding protein, CREB) 的活性,即通过 PKA 促进 CREB 的磷酸化,

上调下游基因的表达,达到调节细胞生理过程的作用^[79]。体外干细胞研究表明,通过上调 PKA 表达的活性,可以促进成骨细胞的分化,并且抑制破骨基因的表达,这显示 PKA 诱导 cAMP/PKA/CREB 通路调控防治骨质疏松的关键作用^[80]。有细胞实验研究了补骨脂甲素对大鼠 BMSCs 的 PKA、CREB mRNA 和蛋白的影响,以期阐明补骨脂甲素抗骨质疏松的分子机制^[81]。研究结果提示,补骨脂甲素通过上调 PKA、CREB mRNA 以及蛋白的表达,活化 cAMP-PKA-CREB 通路,进而促进大鼠 BMSCs 的

成骨分化,这或许是补骨脂甲素纠正骨稳态失衡、抗骨质疏松的作用机制。由于 BMSCs 具有多向分化的特性,补骨脂甲素通过诱导 BMSCs 向成骨细胞分化,对于维护破骨细胞与成骨细胞的动态平衡具有重要意义。与通过介导 Hedgehog 信号通路防治骨质疏松一样,中药分子调控 cAMP/PKA/CREB 信号通路影响破骨细胞以及成骨细胞从而起到抗骨质疏松作用的研究仍较少,更多的中药成分以及分子机制研究仍需进一步深入探讨。中药有效成分对骨质疏松相关信号通路的调控作用总结,见表 1。

表 1 中药有效成分对骨质疏松症相关信号通路的调控作用

Table 1 Regulation effect of active components of Chinese materia medica on osteoporosis-related signaling pathways

中药有效成分	作用细胞、组织或模型	作用机制	相关信号通路	文献
白藜芦醇	OVX 大鼠	↑: β -Catenin, LRP5, Runx2; ↓: GSK-3 β	Wnt/ β -Catenin	19
淫羊藿苷	SD 大鼠 BMSCs	↑: Runx2, ALP, OPN, β -Catenin, Wnt7; ↓: PPAR γ , Adipsin, FABP4, GSK-3 β	Wnt/ β -catenin	20
	OVX 大鼠	↑: OPG; ↓: RANKL, RANK	OPG/RANKL/RANK	38
	OVX 大鼠	↑: β -Catenin, ALP, COL-1, OCN, RunX2, ER α ; ↓: OPG/RANKL	ER α -Wnt/ β -catenin	29
	MC3T3-E1 subclone 14 细胞	↑: BMP-2, BMPR-2, Smad1/5/8, Smad4	BMP-2/Smads	57
杜仲醇	SD 大鼠 BMSCs	↑: Fzd2, Fzd3, β -Catenin; ↓: WIF1	Wnt/ β -Catenin	21
续断皂苷 VI	C57BL/6 雄性小鼠 BMSCs	↑: BMP-2, Runx2, β -catenin, OCN	Wnt/ β -Catenin	22
海参皂苷	OVX 小鼠	↑: β -Catenin, GSK-3 β ; ↓: ALP, OCN, Col1a, Wnt10b, LRP5, BMP2, Runx2, OSX	Wnt/ β -Catenin	23
丹参素	C2C12 细胞, GIO 大鼠	↑: p66 ^{Shc} , PPAR γ 2, Gadd45 α , FoxO3a; ↓: Axin2, β -Catenin	FoxO/Wnt	24
	OVX 大鼠	↑: OPG/RANKL	OPG/RANKL/RANK	37
秦皮乙素	C57BL/6 雄性小鼠 BMSCs	↑: ALP, BSP, Col1, Runx2, Dkk1, Lef1	Wnt/ β -Catenin	25
虎杖苷	OVX 大鼠	↑: β -Catenin; ↓: GSK-3 β	Wnt/ β -Catenin	26
黄芪甲苷	OVX 大鼠	↑: β -Catenin, Wnt2; ↓: p-p66 ^{Shc} /p66 ^{Shc} , FoxO3a	FoxO3a/Wnt2/ β -catenin	27
菟丝子黄酮	OVX 大鼠	↑: β -Catenin; ↓: Dkk1	Wnt/ β -Catenin	28
5-羟甲基糠醛	大鼠 ADSCs	↑: β -Catenin	Wnt/ β -Catenin	30
	大鼠 ADSCs	↑: ERK1/2	MAPKs	30
骨碎补总黄酮	OVX 大鼠	↑: OPG; ↓: RANKL, RANK	OPG/RANKL/RANK	36
	SD 大鼠成骨细胞	↑: P38MAPK, ERK1/2	MAPKs	43
	悬尾雄性 SD 大鼠	↑: BMP-2	BMPs	56
	OVX 大鼠	↓: GAD, GABA, GABABR1, GABABR1 mRNA	GABA	66
	SD 大鼠 BMSCs	↓: Notch1, Hes-1	Notch	73
补骨脂素	hFOB1.19 细胞	↑: ERK, JNK, p38 MAPK	MAPKs	42
	hFOB1.19 细胞	↑: p65, GLUT3	NF- κ B	42
	人 BMSCs	↑: Hes1, Notch1, Jagged1	Notch	72
	SD 大鼠 BMSCs	↑: Shh, Gli1; ↓: Ptch1	Hedgehog	78
芍药苷	RAW264.7 细胞株	↓: P38MAPK	MAPKs	44
	RAW 264.7 细胞株	↓: P65NF- κ B	NF- κ B	44

续表 1

中药有效成分	作用细胞、组织或模型	作用机制	相关信号通路	文献
淫羊藿次苷 II	SD 大鼠成骨细胞	↑: p-p38MAPK, ALP, OPG	MAPKs	45
刺芒柄花素	OVX 大鼠	↑: P38MAPK; ↓: MMP-9, TNF- α , IL-6	P38MAPK/MMP-9	46
三七总皂苷	SD 大鼠 BMSCs	↑: P38MAPK, ERK1/2, Cbfa1, ALP, BSP	MAPKs	47
香叶木素	C57 小鼠	↑: RUNX2; ↓: ERK, JNK, NFATc1, CTSK	MAPKs	48
葛根素	OVX 大鼠	↑: VEGF, NO, p-Akt	PI3K/Akt	52
连翘酯苷 A	OVX 小鼠	↓: TRAF6, I κ B α , P65NF- κ B	NF- κ B	60
	OVX 小鼠	↓: NICD; ↑: RBPJK	Notch	60
蛇床子素	RAW 264.7 细胞株	↑: P65NF- κ B; ↓: NFATc1, CTSK, MMP-9, TRAP, p-I κ B	NF- κ B	61
补骨脂二氢黄酮	OVX 大鼠	↓: GABABR1, GABA	GABA	64
葛根总黄酮	OVX 大鼠	↓: GAD, GABA, GABABR1	GABA	65
淫羊藿总黄酮	SD 雄性大鼠	↑: Notch1, Smd4; ↓: Smd7	Notch	74
补骨脂甲素	大鼠 BMSCs	↑: PKA, CREB	cAMP/PKA/CREB	81

↑: 上调; ↓: 下调

↑: up regulation; ↓: down regulation

11 结语和展望

中药有效成分发挥抗骨质疏松功效主要通过多条信号通路调控破骨与成骨细胞的动态平衡,达到维持骨稳态的最佳状态。此外,对多种信号通路的抑制或激活都可对骨质疏松的病理进展产生影响,因此对信号通路的激活以及抑制需要辩证而定,需要合理、精准的调控。无论是整体水平还是细胞水平,中药有效成分通过对 Wnt、OPG/RANK/RANKL、MAPKs、PI3K/Akt、BMPs、GABA 等多种信号通路进行调控,抑制或活化通路中相关因子的磷酸化,进而调节成骨细胞或破骨细胞的增殖、分化、成熟或凋亡,达到维持骨稳态,发挥抗骨质疏松的目的。

本文发现现有关于中药有效成分抗骨质疏松的研究仍存在一些局限性。首先,现有研究主要从药理学研究的角度进行探讨,缺少从中医药的辨证论治思想角度出发探讨不同中药成分防治骨质疏松的信号通路研究。由于中药的应用需在中医理论下进行辩证使用,因此从中医的辨证论治角度去研究中药成分对骨质疏松信号通路的影响,或许能让中药有效成分影响通路的相关研究有更大的价值。其次,许多信号通路均在防治骨质疏松过程中发挥着重要的作用,而现有的中药有效成分对骨质疏松信号通路的影响研究对象一般仅为单一的信号通路。而本文发现骨碎补总黄酮均可调控 Wnt、MAPKs、GABA 等通路影响破骨细胞以及成骨细胞的活性进而发挥

防治骨质疏松的作用^[36,43,56],因此进一步的研究需深入关注中药调控不同信号通路间的联系以及协同作用以发挥抗骨质疏松作用的影响。此外,Hippo-YAP^[82]、ER α -AMPK-Sirt1^[83]、GH-IGF-1^[84]等信号通路已被证明与骨质疏松具有密切关联,但目前缺少相关中药有效成分对以上通路影响的研究,这将是未来需要深入探讨的方向之一。

随着中医药的发展以及科研实验方法的不断创新,中药有效成分对骨质疏松的干预机制将不断被研究发掘,骨质疏松的中药治疗将有更大的突破。

参考文献

- [1] Kanis J A, McCloskey E V, Harvey N C, et al. Intervention thresholds and the diagnosis of osteoporosis [J]. *J Bone Miner Res*, 2015, 30(10): 1747-1753.
- [2] 薛 鹏, 李玉坤. 2017 年版《原发性骨质疏松症诊疗指南》解读 [J]. *河北医科大学学报*, 2018, 39(1): 1-6.
- [3] Burns R B, Rosen H, Berry S, et al. How would You manage this patient with osteoporosis?: Grand rounds discussion from Beth Israel Deaconess Medical Center [J]. *Ann Intern Med*, 2018, 168(11):801-808.
- [4] Chang B, Quan Q, Li Y, et al. Treatment of osteoporosis, with a focus on 2 monoclonal antibodies [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 8758-8766.
- [5] Vidal M, Thibodaux R J, Neira L F V, et al. Osteoporosis: A clinical and pharmacological update [J]. *Clin Rheumatol*, 2019, 38(2): 385-395.
- [6] Netelenbos J C, Geusens P P, Ypma G, et al. Adherence

- and profile of non-persistence in patients treated for osteoporosis: A large-scale, long-term retrospective study in The Netherlands [J]. *Osteoporos Int*, 2011, 22(5): 1537-1546.
- [7] Hiligsmann M, Bours S P, Boonen A. A review of patient preferences for osteoporosis drug treatment [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2015, 17(9): 61.
- [8] Tadrous M, Mamdani M M, Juurlink D N, et al. Comparative gastrointestinal safety of bisphosphonates in primary osteoporosis: A network meta-analysis-reply to Pazianas and Abrahamsen [J]. *Osteoporos Int*, 2014, 25(11): 2671-2672.
- [9] 史晓林, 王和鸣, 高毅, 等. 绝经后骨质疏松症(骨痿)中医药诊疗指南(2019年版)[J/OL]. 中国骨质疏松杂志, [2020-03-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3701.R.20191126.1415.002.html>.
- [10] Khosla S, Westendorf J J, Oursler M J. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(2):421-428.
- [11] Rauner M, Rachner T D, Hofbauer L C. Bone formation and the Wnt signaling pathway [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(19): 1902.
- [12] Rossini M, Gatti D, Adami S. Involvement of WNT/ β -catenin signaling in the treatment of osteoporosis [J]. *Calcif Tissue Int*, 2013, 93(2):121-132.
- [13] Lories R J, Corr M, Lane N E. To Wnt or not to Wnt: The bone and joint health dilemma [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2013, 9(6):328-339.
- [14] Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease [J]. *Cell*, 2012, 149(6):1192-1205.
- [15] Ahmadzadeh A, Norozi F, Shahrabi S, et al. Wnt/ β -catenin signaling in bone marrow niche [J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 363(2):321-335.
- [16] Huang P, Yang R, Zhang X, et al. Activating Wnt/ β -catenin signaling pathway for disease therapy: Challenges and opportunities [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 196: 79-90.
- [17] Li B, Zhang H W, Zeng M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells protect alveolar macrophages from lipopolysaccharide-induced apoptosis partially by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2015, 39(2):192-200.
- [18] Lu X M, Zhao H, Wang E H. A high-fat diet induces obesity and impairs bone acquisition in young male mice [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(4):1203-1208.
- [19] 喻琴云, 苏孝共, 包琦瑛, 等. 白藜芦醇对去卵巢骨质疏松大鼠 Wnt/ β -Catenin 通路的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(6): 645-649.
- [20] 李智奎, 孔俊博, 赵王林. 淫羊藿苷调控 Wnt/ β -catenin 信号通路干预大鼠 MSCs 成脂成骨双向分化实验研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(24): 2985-2990.
- [21] 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.
- [22] 李家, 林晓晨, 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.
- [23] 王晓红, 李媛媛, 戴宇峰, 等. 海参皂苷对去卵巢小鼠骨密度的改善作用及机制 [J]. 食品科学, 2019, 40(5): 124-129.
- [24] 杨亚军. 丹参素通过调控 FoxO/Wnt 通路抑制氧化应激介导骨质疏松的作用及机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2014.
- [25] 王继荣, 暴一众, 杨舟鑫, 等. 秦皮乙素促进成骨细胞分化延缓增龄性骨质疏松的研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(7): 865-868.
- [26] 徐敏敏, 刘绍凡, 万锐杰, 等. 虎杖苷对去卵巢骨质疏松大鼠 β -Catenin 及 GSK-3 β 蛋白表达的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(1): 103-106.
- [27] 成鹏, 白银亮, 胡彩莉, 等. 黄芪甲苷通过调控 FoxO3a/Wnt2/ β -catenin 通路抑制去卵巢大鼠骨质疏松的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(15): 161-166.
- [28] 赵素霞, 刘会丽, 江红. 菟丝子黄酮通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路干预去卵巢大鼠骨代谢的机制研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(1): 25-28.
- [29] 蔡国雄, 曾意荣, 曾建春. 淫羊藿苷基于 ER α -Wnt/ β -catenin 信号通路对骨质疏松大鼠成骨分化的影响及机制研究 [J]. 中医临床研究, 2018, 10(11): 1-4.
- [30] 张小强. 杜仲提取物 5-羟甲基-2-糠醛诱导细胞成脂分化的信号途径研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
- [31] Romas E, Sims N A, Hards D K, et al. Osteoprotegerin reduces osteoclast numbers and prevents bone erosion in collagen-induced arthritis [J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(4): 1419-1427.
- [32] Zhao Y, Wang H L, Li T T, et al. Baicalin ameliorates dexamethasone-induced osteoporosis by regulation of the RANK/RANKL/OPG signaling pathway [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2020, 14: 195-206.
- [33] Ando K, Mori, R  dini F, et al. RANKL/RANK/OPG: Key therapeutic target in bone oncology [J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2008, 5(3): 263-268.
- [34] Liu W, Zhang X L. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review) [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(5): 3212-3218.

- [35] Amin N, Boccardi V, Taghizadeh M, *et al.* Probiotics and bone disorders: The role of RANKL/RANK/OPG pathway [J]. *Aging Clin Exp Res*, 2020, 32(3): 363-371.
- [36] 刘 康, 吴风晴, 吴连国, 等. 骨碎补总黄酮对骨质疏松模型大鼠 OPG/RANKL/RANK 轴系统的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(6): 652-656.
- [37] 张晓燕, 崔 燎, 吴 铁. 基于 RANKL-RANK-OPG 轴研究丹参素防治牙槽骨质疏松的作用 [J]. 口腔医学研究, 2015, 31(6): 588-590.
- [38] 吴祖锋, 袁 垒, 吴风晴, 等. 淫羊藿苷对骨质疏松症模型大鼠 OPG/RANKL/RANK 轴系统影响的实验研究 [J]. 甘肃中医学院学报, 2016, 33(3): 4-7.
- [39] Kim E K, Choi E J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(4): 396-405.
- [40] de Launay D, van de Sande M G, de Hair M J, *et al.* Selective involvement of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases in early rheumatoid arthritis (1987 ACR criteria compared to 2010 ACR/EULAR criteria): A prospective study aimed at identification of diagnostic and prognostic biomarkers as well as therapeutic targets [J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(3): 415-423.
- [41] Lane N E. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2006, 194(2 Suppl): S3-S11.
- [42] 李启活. 补骨脂素激活 MAPK-NF- κ B 信号通路促进成骨细胞增殖的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [43] 朱晓峰, 王廷春, 张荣华, 等. 骨碎补总黄酮对晚期糖基化终末产物作用下成骨细胞分化及 p38 和 ERK1/2 蛋白激酶表达的影响 [J]. 中成药, 2012, 34(3): 412-417.
- [44] 林紫微. 芍药苷抗骨质疏松效应及其 GPR30 相关机制探讨 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [45] 龚一听, 刘尚全, 袁 媛, 等. 淫羊藿次苷 II 通过 p38MAPK 调控成骨细胞护骨素表达的体外研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(12): 1790-1794.
- [46] 喻琴云, 詹晓峰, 黄 彦. 刺芒柄花素对去势骨质疏松大鼠 P38MAPK/MMP-9 信号通路的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(12): 1371-1376.
- [47] 陈 斌. 三七总皂甙对骨髓基质细胞成骨分化的影响及机制研究 [D]. 汕头: 汕头大学, 2010.
- [48] 邵思远. 香叶木素调控破骨细胞分化的机制研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2019.
- [49] Pastorino J G, Chen S T, Tafani M, *et al.* The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(13): 7770-7775.
- [50] Liu X D, Cai F, Liu L, *et al.* MicroRNA-210 is involved in the regulation of postmenopausal osteoporosis through promotion of VEGF expression and osteoblast differentiation [J]. *Biol Chem*, 2015, 396(4): 339-347.
- [51] Hu K, Olsen B R. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(2): 509-526.
- [52] 曾锁林, 施熊兵. 葛根素对去势雌性大鼠骨质疏松症及 PI3K/AKT 信号转导通路的影响 [J]. 河北医药, 2018, 40(23): 3566-3569.
- [53] Ghosh-Choudhury N, Abboud S L, Nishimura R, *et al.* Requirement of BMP-2-induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt serine/threonine kinase in osteoblast differentiation and Smad-dependent BMP-2 gene transcription [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(36): 33361-33368.
- [54] Ando T, Ichikawa J, Wako M, *et al.* TWEAK/Fn14 interaction regulates RANTES production, BMP-2-induced differentiation, and RANKL expression in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(5): R146.
- [55] Agas D, Sabbieti M G, Marchetti L, *et al.* FGF-2 enhances Runx-2/Smads nuclear localization in BMP-2 canonical signaling in osteoblasts [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(11): 2149-2158.
- [56] 沈 智, 曾景奇, 李益亮, 等. 骨碎补总黄酮对悬尾实验性骨质疏松模型大鼠骨密度及 BMP-2 mRNA 的影响 [J]. 中医药导报, 2019, 25(21): 33-36.
- [57] 安 庆, 刘国雄, Bikash K S, 等. 淫羊藿苷对 MC3T3-E1 细胞增殖分化的影响及机制研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(6): 893-898.
- [58] Sun J, Xu G R, Wang Z S, *et al.* The effect of NF- κ B signalling pathway on expression and regulation of nacrein in pearl oyster, *Pinctada fucata* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0131711.
- [59] Xu J K, Wu H F, Ang E S, *et al.* NF-kappaB modulators in osteolytic bone diseases [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009, 20(1): 7-17.
- [60] 孙雪武. 连翘酯苷 A 抑制破骨细胞分化的机制探讨及其治疗应用 [D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [61] 王礼宁. 蛇床子素对体外培养破骨细胞分化成熟的影响及作用机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [62] Owens D F, Kriegstein A R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3(9): 715-727.
- [63] Marcoli M, Candiani S, Tonachini L, *et al.* In vitro modulation of gamma amino butyric acid (GABA) receptor expression by bone marrow stromal cells [J].

- Pharmacol Res*, 2008, 57(5): 374-382.
- [64] 朱振标, 沈 慧, 林之斌, 等. 补骨脂二氢黄酮对去卵巢大鼠骨质疏松症影响的实验研究 [J]. 陕西中医, 2015, 36(8): 1083-1084.
- [65] 朱振标, 张 寿, 沈 慧, 等. 葛根总黄酮对去卵巢大鼠骨组织 γ -氨基丁酸信号通路的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(16): 3940-3942.
- [66] 吕辰鹏. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨组织 GABA 信号通路的影响 [D]. 广州: 暨南大学, 2011.
- [67] Henrique D, Schweisguth F. Mechanisms of Notch signaling: a simple logic deployed in time and space [J]. *Development*, 2019, 146(3): dev172148.
- [68] Falo-Sanjuan J, Bray S J. Decoding the Notch signal [J]. *Development*, 2020, 62(1): 4-14.
- [69] Zanotti S, Canalis E. Notch signaling and the skeleton [J]. *Endocr Rev*, 2016, 37(3): 223-253.
- [70] Tezuka K, Yasuda M, Watanabe N, *et al.* Stimulation of osteoblastic cell differentiation by Notch [J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(2): 231-239.
- [71] Canalis E, Adams D J, Boskey A, *et al.* Notch signaling in osteocytes differentially regulates cancellous and cortical bone remodeling [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(35): 25614-25625.
- [72] 邢贞武. 补骨脂素对绝经后骨质疏松患者骨髓间充质干细胞 Notch 信号通路的影响 [J]. 中医学报, 2017, 32(11): 2181-2184.
- [73] 韩亚力, 罗 奕, 曾佳学. 骨碎补总黄酮基于 Notch 信号通路改善骨质疏松的作用及机制研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(2): 261-266.
- [74] 汪小飞, 李晶晶. 淫羊藿总黄酮对老年骨质疏松大鼠 Notch 和 Smads 通路蛋白表达的影响 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2019(2): 1-5.
- [75] Lin J C, Liu Z G, Yu B, *et al.* MicroRNA-874 targeting SUFU involves in osteoblast proliferation and differentiation in osteoporosis rats through the Hedgehog signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 506(1): 194-203.
- [76] Luo M, Huang H X, Huang H, *et al.* Hedgehog signaling pathway and osteoporosis [J]. *China J Orthop Traumatol*, 2014, 27(2): 169-172.
- [77] Han L, Zhang X L, Li X, *et al.* Hedgehog pathway is associated with the proliferation and differentiation of osteoblasts [J]. *Shanghai J Stomatol*, 2009, 18(3): 287-290.
- [78] 韩 宇, 郭晏华, 于 艳. 补骨脂素介导 Hedgehog 信号通路促进骨髓 MSC 成骨分化作用研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(6): 1133-1137.
- [79] Weng L, Wang W, Su X, *et al.* The effect of cAMP-PKA activation on TGF- β 1-induced profibrotic signaling [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(5): 1911-1927.
- [80] 张 磊, 肖 扬, 吴震东, 等. cAMP/PKA 信号通路介导人脂肪干细胞成骨分化的体外试验 [J]. 临床骨科杂志, 2010, 13(5): 556-558.
- [81] 韩 宇, 郭晏华, 于 艳. 补骨脂甲素介导 cAMP/PKA/CREB 信号通路调控促进骨髓 MSC 成骨分化作用研究 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(7): 1597-1600.
- [82] 魏秋实, 邓伟民. TAZ 介导的 Wnt/ β -catenin 信号通路与骨髓基质干细胞的成骨分化 [J]. 生命科学, 2014, 26(3): 314-318.
- [83] 姜 涛, 邵 敏, 陈庆真, 等. ER α -AMPK-Sirt1 信号通路在骨质疏松症中的作用 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(8): 1166-1171.
- [84] 贾强强, 陈贝贝, 朱如愿, 等. 女贞子对去卵巢大鼠抗骨质疏松作用及其对 GH/IGF-1 信号通路的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3852-3858.