

· 综述 ·

左归丸治疗骨质疏松症相关机制

柴毅, 樊巧玲*

(南京中医药大学, 南京 210023)

[摘要] 左归丸是中医经典方剂之一,为“阳中求阴”的代表方,具有滋肾补阴的功效和纯补无泻的特点。骨质疏松症是一种以骨量低,骨组织结构破坏,导致骨脆性增加,骨强度下降及骨折风险增加,易发生骨折为特征的全身性骨病,它已成为威胁人类健康的常见疾病之一。中医学有“肾藏精,主骨生髓”的理论,左归丸在治疗骨质疏松症方面有着较好的临床疗效,同时也具有较少的副作用。近年来,针对左归丸治疗骨质疏松症的实验研究数量与日俱增,相关分子以及信号通路的机制研究亦取得一定拓展,特别是左归丸治疗骨质疏松症的相关机制研究陆续涌现。本研究通过整理左归丸治疗骨质疏松症的文献,对其作用机制及信号通路,包括环腺苷酸(cAMP)/蛋白激酶(PKA)/cAMP 应答元件结合蛋白(CREB)通路,Notch 信号通路,转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)/Smad 信号通路,Wnt/ β -链蛋白(β -catenin)信号通路和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路等方面做一综述。这些研究表明左归丸治疗骨质疏松症具有多靶点、多途径的干预特点。虽然左归丸治疗骨质疏松症的疗效明确,且对于一些基本的机制研究亦取得一定进展,但仍存在一定的局限性,尚需结合现代最新研究方法和技术对其机制进行更全面更深入的探索。

[关键词] 左归丸; 骨质疏松症; 环腺苷酸(cAMP)/蛋白激酶(PKA)/cAMP 应答元件结合蛋白(CREB)信号通路; Notch 信号通路; 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)/Smad 信号通路; Wnt/ β -链蛋白(β -catenin)信号通路; 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R287;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)17-0201-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181530

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180516.0953.023.html>

[网络出版时间] 2018-05-16 11:20

Relevant Mechanisms of Zuoguiwan in Treating Osteoporosis

CHAI Yi, FAN Qiao-ling*

(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] Zuoguiwan is one of classic formulas of traditional Chinese medicine (TCM), which is represented the method of seeking yin from yang and characterized by the effect of enriching and nourishing kidney Yin and the complete supplement without any drain. Osteoporosis is a systemic bone disease characterized by low bone mass, structural failure of bone tissue, increased bone brittleness, decreased bone strength and increased risk of fracture, and become one of the threatening in human health. TCM believes that kidney contains the essence and kidney governs the bones and engenders marrow, and Zuoguiwan has a better clinical efficacy in treating osteoporosis and fewer side effect. There have been an increasing number of experimental studies in treating osteoporosis with Zuoguiwan, especially for molecule and mechanism of signaling pathway. The objective of this research was to summarize signaling pathways of Zuoguiwan in treating osteoporosis, including cyclicadenosine 3', 5'-monophosphate/protein kinase/cAMP response element-binding protein (cAMP/PKA/CREB) signaling

[收稿日期] 20171205(024)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573874)

[第一作者] 柴毅,在读博士,从事中药复方的药效机制及配伍规律研究,E-mail: chinachaiyi@163.com

[通信作者] *樊巧玲,博士,教授,从事中药复方的药效机制及配伍规律研究,E-mail: njfanql@163.com

pathway, Notch signaling pathway, transforming growth factor-beta 1 (TGF- β_1) /Smad signaling pathway, Wnt / β -catenin signaling pathway and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. This study also confirmed that Zuoguiwan had intervention characteristics of multiple target points and multiple paths. Although the effect and basic mechanisms of Zuoguiwan were proved, there are still some limitations. More comprehensive and in-depth studies shall also be conducted using the latest modern research methods and techniques.

[**Key words**] Zuoguiwan; osteoporosis; cyclicadenosine 3', 5'-monophosphate/protein kinase/cAMP response element-binding protein (cAMP/PKA/CREB) signaling pathway; Notch signaling pathway; transforming growth factor-beta 1 (TGF- β_1) /Smad signaling pathway; Wnt/ β -catenin signaling pathway; mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是最常见的骨骼疾病,是一种以骨量低,骨组织结构破坏,导致骨脆性增加,骨强度下降及骨折风险增加,易发生骨折为特征的全身性骨病^[1-2]。流行病学资料显示,我国 OP 的患病率已从 2008 年的 14.94% 上升至 2015 年的 17.96%,女性的患病率 25.41% 显著高于男性的 15.33%,农村人口的患病率 23.92% 略高于城市人口的 20.87%,南方的患病率 23.17% 高于北方的 20.13%^[3]。骨质疏松症已成为威胁人类健康的常见疾病之一。中医学有“肾藏精,主骨生髓”的理论,骨质疏松症可归属于“肾虚”“虚劳”“骨痹”“骨痿”等疾病范畴^[4],在中医学病证中以肾虚证特别是肾阴虚证最为常见。左归丸出自《景岳全书·新方八阵》,为“阳中求阴”的代表方,由熟地黄、山药、枸杞子、山茱萸、川牛膝、菟丝子、鹿角胶、龟甲 8 味药组成,具有滋补肾阴,填精补髓之功和纯补无泻的特点。左归丸在临床上应用较为广泛,特别是在骨质疏松症方面^[5]。宋献文等^[6]对 75 例女性骨质疏松症患者进行研究,发现经左归丸治疗 12 个月后,患者 L₂ ~ L₄ 和 Ward 三角骨密度分别较治疗前增加 2.32% 和 2.15%,治疗有统计学差异性,且未发生骨折,说明左归丸治疗女性骨质疏松症疗效显著。不仅如此,王如然等^[7]研究了左归丸对 2 型糖尿病合并骨质疏松症的治疗情况,结果治疗组骨密度高于对照组,血钙素、甲状旁腺素和碱性磷酸酶较对照组显著降低,并且治疗组骨痛的平均起效时间、平均缓解时间较观察组均明显缩短,各组的血清钙、血清磷及肝肾功能均未见异常。表明左归丸还可有效治疗 2 型糖尿病合并的 OP 且无明显不良反应。由此可见,临床应用左归丸治疗骨质疏松症具有一定的效果,且安全性也较为可靠。近年来,针对左归丸治疗骨质疏松症的实验研究与日俱增,相关分子以及信号通路的机制研究亦取得一定拓展。本文针对现阶段左归丸治疗骨质疏松症的相关信号通路与

机制方面的研究进行综述。

1 左归丸治疗骨质疏松症的环腺苷酸(cAMP)-蛋白激酶(PKA)-cAMP 应答元件结合蛋白(CREB)信号通路途径

G 蛋白偶联受体(GPCR)是细胞所有信号受体分子中最为常见的一种。G 蛋白是一类由 G α , G β 和 G γ 三个蛋白亚基组成的异源三聚体蛋白质家族。当 G α 与三磷酸鸟苷(GTP)结合时就会进入激活状态,G α /GTP 复合物与 G β , G γ 亲和力下降,使其从膜上分离下来,结合并激活下游的效应信号分子,进而调控细胞生理活动。G 蛋白偶联受体 48 (GPR48)也称 LGR4,属于 GPCR 的糖蛋白受体亚家族。GPR48 在多种器官发育中起着关键作用,尤其在骨、软骨发育过程中呈现高表达^[8]。相关研究发现,GPR48^{-/-}小鼠出现骨骼发育障碍等表现,如四肢短小^[9-10]。此外,小鼠类骨质的形成和成骨的生长速度等均受到不同程度的影响,主要表现为沉浮细胞分化矿化延迟,而破骨细胞的数量明显增加。LUO 等^[11]进一步研究发现,GPR48 可以作为核转录因子- κ B 受体活化因子配体(RANKL)的第二受体与核转录因子- κ B 受体活化因子(RANK)竞争结合 RANKL,随后经 G α_q /糖原合成酶激酶 3- β (GSK3- β) 信号通路抑制活化 T 细胞核因子 1 蛋白(NFATC1)的表达与活性,即 RANKL/GPR48/G α_q /GSK3- β /NFATC1 信号通路,从而抑制破骨细胞的分化和骨的重吸收。可见 GPR48 在骨代谢研究中的重要性日益突出。尚有研究证实,GPR48 活化越强,转化成 cAMP 分子浓度越高,即 cAMP 与 GPR48 存在级联反应且呈正相关^[12]。以上研究表明 GPR48 可能通过介导 cAMP/PKA/CREB 信号通路及其下游因子调控成骨细胞、破骨细胞等生理活动参与骨形成和骨重建。

骨形态发生蛋白 9 (BMP9) 在诱导间充质

干细胞(MSCs)方面有着很强的能力^[13]。BMP9 可经 cAMP/PKA/CREB 途径下调蛋白激酶 A 抑制剂 γ (PKI γ) 的表达,最终磷酸化 CREB 诱导 MSCs 成骨分化^[14-15],从而降低骨质疏松症的发生。周强等^[16-17]发现,摘除双侧卵巢的雌性大鼠股骨和肾组织中 BMP9, GPR48 和 CREB 的蛋白表达水平有明显的下降,使用左归丸颗粒剂灌胃后治疗后可使三者的表达上调。然而, BMP9, GPR48 和 CREB 在下丘脑组织中的表达情况与其在肾、骨组织中的表达水平呈相反趋势。在模型大鼠下丘脑组织中三者表达水平升高,使用左归丸颗粒剂常规剂量水溶灌胃均可使三者的表达下调,这可能与“下丘脑-垂体-靶腺轴”学说的负反馈调节机制相关^[16]。此类研究说明左归丸可上调骨组织中 BMP9 的表达,经 GPR48 介导的 cAMP/PKA/CREB 信号通路纠正骨代谢偶联失衡的情况并促进骨形成治疗骨质疏松症。

2 左归丸治疗骨质疏松症的 Notch 信号通路途径

Notch 信号通路是为数不多的决定细胞命运和最终形态发育的细胞信号中枢机制之一,它对细胞的分化、增殖、凋亡甚至对细胞的发育的全过程有着重要的影响^[18]。Notch 信号通路包含有 Notch 受体(Notch1~4),配体(Jagged1, Jagged2, Delta1, Delta3, Delta4),正负性调节因子和转录因子^[19]。Notch 与配体结合激活后会被去整合素-金属蛋白酶 10(ADAM10)和 γ -secretase 分割,随后 Notch 胞质片段入核与转录因子 CSL/RBPJk 等相互作用,调节 HES 家族和 HES 相关抑制基因等 CSL 靶基因的表达^[20]。研究显示 Notch 敲除小鼠表现出严重的骨骼畸形,提示 Notch 信号通路在骨与骨骼发育中起关键作用^[18,21]。Notch 配体和受体的表达异常均会损伤成骨与破骨祖细胞的分化^[22]。此外, BMP9 除了参与 cAMP/PKA/CREB 信号通路调控,还与很多信号通路存在信号关联,特别是 Wnt 和 Notch 信号通路^[15,23],如 BMP9 可以上调 Notch 下游转录因子 Hey1 的表达^[24]。BMP9 还可诱导成骨分化与血管生成,而阻断 Notch 信号通路可抑制此过程^[25]。这表明 BMP9 可能也是 Notch 信号通路的一个上游信号分子^[26]。因此, Notch 信号通路与骨质疏松症的发生发展及治疗存在着密切的关系。

周强等^[27]对去卵巢骨质疏松症大鼠股骨中的 Notch1 和 BMP 蛋白表达进行了研究,发现其 Notch1 和 BMP9 的蛋白表达水平较正常组有明显的下降,使用左归丸颗粒剂灌胃后可上调 BMP9 的表达,在

其作用下使 Notch1 表达增加,进而激活 Notch 信号通路纠正骨质疏松症的骨代谢异常。孙鑫^[28]证实骨组织与肾组织 Notch 信号通路中 Notch1, Jagged1 及 HES 蛋白含量及相应 mRNA 表达降低可能是绝经后骨质疏松症骨代谢失常的分子生物学机制之一。经左归丸颗粒剂灌胃可提高 Notch1 与 Jagged1 的表达进而激活 Notch 信号通路,并最终进入细胞核作用于 HES 靶基因使其蛋白表达上调,从而治疗骨质疏松症。综上,左归丸上调 BMP9 的表达,将传递信号至 Notch 信号通路的配体与受体并最终作用于细胞核 CSL 靶基因可能是左归丸治疗骨质疏松症的机制之一。

3 左归丸治疗骨质疏松症的转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)/Smad 信号通路途径

TGF- β 是一种具有广泛生物活性的多效性细胞因子,它在调节众多机体生理与自我平衡过程中起到关键作用^[29]。在哺乳动物中, TGF- β_1 是其中一种亚型,包含有 3 类受体,即 T β R I, T β R II, T β R III^[30]。当参与骨代谢的信号分子与 T β R II 结合后, T β R II 进一步聚集 T β R I 并与之结合,随后使 T β R I 胞内段 Ser/Thr 残基活化最终激活 T β R I^[31]。活化的 T β R I 可招募并磷酸化下游的基因调节蛋白 Smad 家族。Smads 按照功能划分为 3 类,一是共同通路型 Smad(Co-Smad),即 Smad4;二是受体激活型 Smad(R-Smads),其中包括 Smad1, 2, 3;三是抑制性 Smad(I-Smad),如 Smad6 和 Smad7。一般来说, R-Smads 被磷酸化后便从受体上脱离再与 Smad4 结合成复合物进入细胞核调控基因表达。研究显示 TGF- β_1 /Smads 信号通路在成骨细胞分化与骨形成中扮演重要角色^[32]。许多参与骨代谢的基因或蛋白包括人类相关转录因子 2(run-related transcription factor-2, RUNX2), I 型胶原(Collagen I), II 型胶原(Collagen II), 脂肪酸样化合物过氧化物酶增殖剂激活受体 γ (PPAR γ), PPAR γ 2, CCAAT 增强子结合蛋白 α (C/EBP α) 和 CCAAT 增强子结合蛋白 β (C/EBP β) 等表达均受到 TGF- β_1 /Smads 信号通路的调节。RUNX2 是调控成骨细胞和破骨细胞的分化促进骨形成的关键调控因子^[33]。在成骨细胞分化和间充质前体细胞分化的过程中, TGF- β_1 会使 RUNX2 水平上调并介导 RUNX2 磷酸化参与骨重建^[34-35]。在骨骼中, 大约 95% 的胶原种类是 Collagen I。它为骨骼提供了一定的黏弹性强度, 扭转刚度和承载力, 同时也是评价骨髓间充质

干细胞向成骨细胞分化的特征性标志,是组成骨框架和形成骨的力学强度的最基本的蛋白^[36]。Collagen I 可通过 TGF- β_1 /Smads 信号通路的调控参与骨髓间充质干细胞(BMSCs)的分化过程,且两者具有协同作用^[37-38]。PPARs 是配体调节核激素受体家族成员。其转录因子 PPAR γ 和 PPAR γ_2 等可参与各种生理过程,多在脂肪组织及免疫系统表达,与脂肪细胞分化,机体免疫等关系密切^[39]。许多骨骼疾病的共同特征是骨髓脂肪的积累,PPAR γ 和 RUNX2 是参与成骨分化/成脂分化中的两个关键转录因子,且两者之间存在拮抗作用^[40]。此外,PPAR γ 还可通过抑制 BMSCs 成骨细胞分化所需的核蛋白结合因子 $\alpha 1$ (Cbf $\alpha 1$) 抑制 Collagen I 等基因的表达。C/EBP β 的诱导作用发生于成脂化过程的初期,而 C/EBP α 则作用于成脂化末期。C/EBP α 与 C/EBP β 均可诱导 PPAR γ 表达促进 BMSCs 成脂化导致骨质疏松症^[41-43]。由此可见,C/EBP α , C/EBP β 通过诱导 PPAR γ 表达从而抑制 RUNX2, Collagen I, Collagen II 等基因表达可能是导致骨质疏松症的机制之一,而 TGF- β_1 /Smads 信号通路在其中扮演关键角色。

左归丸治疗骨质疏松症在 TGF- β_1 /Smads 信号通路中的机制主要是从骨组织、肾组织和 BMSCs 开展的。研究显示,左归丸中成药研粉制成的混悬液灌胃后可改善 OP 模型动物骨质疏松骨代谢相关指标,提高骨组织 TGF- β_1 , Smad3, p-Smad3 和 Smad4 mRNA 水平并增加 RUNX2, Collagen I 和 Collagen II 的蛋白水平,且高中低剂量之间均无统计学差异性^[44-46]。在肾组织中,使用中成药左归丸研粉制成的混悬液和中剂量水煎剂灌胃均可提高 OP 病理状态下 TGF- β_1 , TGF- β_1 mRNA, T β R I, T β R II 的表达水平,且可提高下游 Smad1, Smad2, Smad4 和 Smad4 mRNA 的表达水平,其中混悬液左归丸制剂以低剂量干预效果最为明显^[47-49]。左归丸水提液与醇提液中剂量对第 4 代 BMSCs 经成骨诱导并饥饿化后进行体外干预的研究结果显示,TGF- β_1 , T β R I, T β R II, Smad2, Smad3, Smad4 和 RUNX2, Collagen I 蛋白及 mRNA 的表达均较对照组上调,而 C/EBP α 与 PPAR γ 蛋白及 mRNA 表达下调^[50]。由此可见,左归丸可能通过下调 C/EBP α 减少 PPAR γ 的诱导,进而降低对 RUNX2 的拮抗和 Collagen I 等的抑制作用达到治疗骨质疏松症的目的。这个过程可能通过促使 T β R I 与 T β R II 活化并激活 TGF- β_1 /Smads 信号通路,与下游 R-Smads 结合并经磷

酸化 Smad4 形成复合物入核调控相关基因表达实现的。

4 左归丸治疗骨质疏松症的 Wnt / β -链蛋白 (β -catenin) 信号途径

Wnt 信号通路的激活在个体发育的许多过程中起重要作用,包括骨骼发育和骨细胞的生长、分化等^[51]。然而 Wnt 信号通路的过度活化或失活都会导致疾病的发生。Wnt 信号通路是骨骼健康与疾病中的关键调控通路,因而该通路也成为治疗骨质疏松症的新靶点^[52]。骨保护素(OPG)的合成可经该通路调控。Wnt 信号通路有两种细胞表面受体蛋白,即膜受体 Frizzled(Fz)和共受体低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)。Fz 可直接与 Wnt 结合,而 LRP 则需以信号依赖的方式与 Fz 结合。此外,Wnt 信号转导过程中的关键因子 β -catenin 扮演了转录激活因子和膜骨架连接蛋白的双重角色。在静息状态下,细胞质中的 β -catenin 会被降解复合物中的激酶磷酸化,进而招募泛素化连接酶被泛素化,最终 β -catenin 被蛋白酶体降解维持较低水平的状态。当 Wnt 信号通路被激活时,Fz 与 LRP 结合并磷酸化 LRP,进而影响降解复合物的结构,阻止了 β -catenin 的磷酸化与泛素化,最终 β -catenin 入核激活下游靶基因的表达调控骨形成与骨吸收。由此可见,Wnt, LRP 和 β -catenin 是该通路调控骨代谢的重要组成部分^[53]。

研究表明,在 OP 不同的病理模型中,Wnt 信号通路体现出不同的调控方式。在去卵巢 OP 大鼠模型中,Wnt 信号通路关键蛋白表达上调,提示去卵巢 OP 大鼠呈高水平骨代谢状态^[54-55]。而经激素诱导的 OP 大鼠或细胞模型 Wnt 关键蛋白水平降低,说明该模型中骨代谢水平较低^[56]。其可能的原因在于 Wnt 信号通路本身具有正负调控的特性或与使用的激素作用有关。付小卫^[57]采用去卵巢 OP 大鼠进行研究,发现模型组 Wnt1, LRP 和 β -catenin 蛋白表达均上调,而经左归丸中剂量水煎剂灌胃干预的大鼠三者的异常表达可被逆转。有研究者通过激素诱导建立 OP 模型,前者使用左归丸水煎剂中剂量干预,后者采用左归丸乙醇浸泡超声提取减压浓缩中剂量干预,结果两者均可使低水平的 Wnt1, LRP 和 β -catenin 蛋白表达上调并改善大鼠骨质疏松表型^[56,58]。可见,左归丸可对 Wnt / β -catenin 信号通路进行双向调控,从而改善骨转换率,使骨形成与骨吸收趋于平衡,减少骨量丢失。这可能是左归丸治疗 OP 的另一机制。

5 左归丸治疗骨质疏松症的丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路途径

MAPK 家族介导广泛的细胞外信号应答,包括调节细胞生长、分化、存活与免疫应答等。胞外信号又包含生长因子、激素、细胞因子和压力等。在哺乳动物中有 4 条主要的 MAPK 信号转导通路,细胞外调节蛋白激酶 (ERK1/2) 通路, c-Jun 氨基端激酶 (JNK) 通路, p38 MAPK 通路和大丝裂素活化蛋白激酶 (ERK5) 通路^[59]。这 4 条通路均可激活各自不同的转录因子,进而介导相关细胞生物学效应,与此同时这些转导通路之间也存在着广泛的相互联系并能相互协同或抑制。其中, ERK1/2 信号通路与生长因子相关信号应答有关,而 p38 MAPK 通路通常与胞外压力信号应答有关。有研究证实, BMP9 可使间充质祖细胞中的 p38 MAPK 与 ERK1/2 发生磷酸化并激活相应信号通路诱导细胞成骨分化^[60],这表明 MAPK 信号通路的生理功能与成骨分化和骨形成有关。

5.1 左归丸治疗骨质疏松症的 ERK1/2 信号通路途径

Ras 蛋白是 G 蛋白家族中的一员。一些调控骨代谢的信号分子(如 TGF- β)将 Ras 激活使其形成活化态的 Ras-GTP 进而启动 Ras-MAPK 磷酸化级联反应,最终将 ERK 活化。活化后的 ERK 激酶进入细胞核调控下游基因的表达(如基质金属蛋白酶 9),进而影响骨细胞的生理活动。例如,机械张力性刺激可通过 ERK1/2 信号通路途径上调 RUNX2 蛋白表达从而诱导 BMSCs 成骨分化改善骨质疏松^[61]。

蒿长英等^[62-63]将左归丸中成药制成混悬液,每天对大鼠灌胃 2 次,连续 7 d,最终制成含药血清对骨前体细胞系 MC3T3-E1 进行干预,发现左归丸可上调 p-ERK1/2 蛋白表达,提高 Cbfa1 和 Collagen I mRNA 与蛋白的分泌,增强细胞基质钙化,促进 MC3T3-E1 细胞增殖治疗骨质疏松症,且左归丸低剂量组刺激效果更明显,而 ERK1/2 信号通路特异性阻滞剂 PD98059 可逆转该过程。此外,何丽娟^[64]证实左归丸中药饮片水煎剂常规剂量通过 ERK1/2 信号通路途径对 BMSCs 的作用与 MC3T3-E1 的机制相似,也可通过上调 p-ERK1/2 蛋白表达,提高 Cbfa1 与 Collagen I mRNA 及蛋白的分泌,增加钙化结节,促进 BMSCs 成骨分化。章建华等^[58]做了进一步研究,发现左归丸在 OP 肾阴虚证型下对 ERK1/2 信号通路的作用较肾阳虚型的作用更强。

5.2 左归丸治疗骨质疏松症的 p38 MAPK 信号通

路途径 与许多其他蛋白激酶相同, MAPK 家族信号通路的激活需要活化环位点的磷酸化。p38 MAPK 被 Thr-Gly-Tyr 组成的活化环序列双重磷酸化激活,进而启动 MAPK 级联反应,最终使 MAPK (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) 激活,活化的 MAPK 入核,调控特异性基因表达^[65]。研究表明, p38 MAPK 对骨细胞的分化、生成、凋亡和矿化等过程可进行调控。因此, p38 MAPK 信号通路也是参与 OP 发生的通路途径之一。刘立萍等^[66]研究发现,左归丸中成药常规剂量灌胃后制成的含药血清能够显著增加 MC3T3 细胞的活力和 p-p38 MAPK 蛋白表达水平,并上调 RUNX2 和 Collagen I 的蛋白表达,促进骨形成。表明左归丸可通过 p38 MAPK 信号通路途径调控成骨相关蛋白的表达达到治疗 OP 的目的。

近来,除了左归丸治疗 OP 信号通路相关机制的研究之外,尚出现诸多对基础代谢物质的测定研究。这些基础代谢物质包括 I 型前胶原羧基端前肽 (PICP), I 型胶原羧基端肽 β (β -CTX), 脂肪型脂肪酸结合蛋白 4 (FABP4), 胰岛素样生长因子-I (IGF-I), 抗酒石酸酸性磷酸酶 (Str-ACP), 尿羟脯氨酸与肌酐比值 (HOP/Cr), 白细胞介素-1, 4, 6 (IL-1, 4, 6), 血清磷和钙相关代谢激素等。应用左归丸治疗 OP 的过程中发现其对上述基础物质均有不同程度的调节。见图 1。

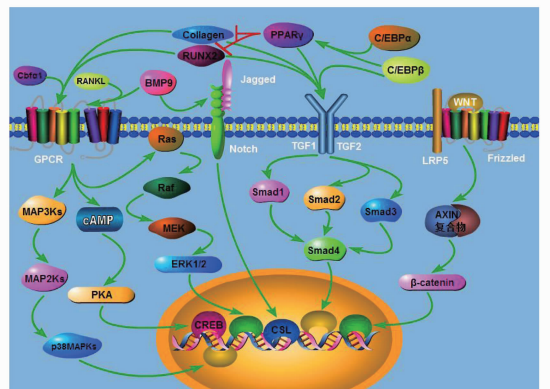


图 1 左归丸治疗骨质疏松症的相关信号通路机制
Fig.1 Signaling pathway mechanism of osteoporosis in treatment of Zuoguiwan

6 小结

左归丸治疗 OP 的疗效明确,且对于一些基本的机制研究亦取得一定进展,本研究在一定程度上整合了截至当前的左归丸治疗 OP 的机制,一方面为实验研究提供一定的理论依据,另一方面为临床研究提供可行的科研思路。本研究也发现对于信号

通路机制的阐明尚需更全面更深入的科学研究。例如左归丸治疗 OP 的机制与 PI3K/Akt 信号通路, JAK/STAT 信号通路和 Hedgehog 信号通路等关系尚需研究进一步探索。此外, 信号通路存在更复杂的信号转导机制, 特别是左归丸治疗 OP 对上游胞外信号分子的调控种类和下游细胞核内基因的表达以及 miRNA, lncRNA 和 ceRNA 等调控机制有待挖掘。而且这些不同的信号通路之间还存在广泛的相互作用, 这对左归丸治疗 OP 的机制研究带来了巨大挑战, 而结合现代医学研究方法思路与前沿技术有望能够为阐明左归丸治疗 OP 的机制带来突破性进展。

[参考文献]

[1] Burekhardt P, Fleisch F, Fujita H A, et al. Consensus development conference: prophylaxis and treatment of osteoporosis[J]. *Am J Med*, 1991, 90(1): 107-110.

[2] Listed N. NIH consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy, March 7-29, 2000; highlights of the conference[J]. *South Med J*, 2001, 94(6): 569-573.

[3] PENG C, LI Z, HU Y. Prevalence of osteoporosis in China: a Meta-analysis and systematic review[J]. *BMC Public Health*, 2016, 16(1): 1039-1050.

[4] 许惠娟, 李生强, 陈娟, 等. 绝经后骨质疏松症不同年龄段中医证型分布特点[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(12): 157-161.

[5] 郭杨, 马勇. 中医药治疗骨质疏松症的常用处方分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(7): 188-191.

[6] 宋献文, 李昊, 计佩芳. 左归丸治疗女性肾阴虚型骨质疏松症 38 例[J]. *河南中医*, 2013, 33(6): 971-972.

[7] 王如然, 鞠大宏, 黄胜男, 等. 左归丸治疗 2 型糖尿病合并骨质疏松肾阴虚证 30 例临床观察[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2014, 20(2): 259-261.

[8] JIN C, YIN F, LIN M, et al. GPR48 regulates epithelial cell proliferation and migration by activating EGFR during eyelid development[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(10): 4245-4253.

[9] LI X, LU Y, SUN H, et al. G protein-coupled receptor 48 upregulates estrogen receptor alpha expression via cAMP/PKA signaling in the male reproductive tract[J]. *Development*, 2010, 137(1): 151-157.

[10] LUO J, ZHOU W, ZHOU X, et al. Regulation of bone formation and remodeling by G-protein-coupled receptor 48[J]. *Development*, 2009, 136(16): 2747-2756.

[11] LUO J, YANG Z, MA Y, et al. LGR4 is a receptor for

RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption[J]. *Nat Med*, 2016, 22(5): 539-546.

[12] Ohta Y, Nakagawa K, Imai Y, et al. Cyclic AMP enhances Smad-mediated BMP signaling through PKA-CREB pathway[J]. *J Bone Miner Metab*, 2008, 26(5): 478-484.

[13] WANG Y, FENG Q, JI C, et al. RUNX3 plays an important role in mediating the BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(6): 1991-1999.

[14] 宋涛, 刘跃亮, 赵艳芳, 等. cAMP-PKA-CREB 信号通路在骨形态发生蛋白 9 诱导小鼠间充质干细胞成骨分化中的作用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2014, 27(2): 189-193, 196.

[15] ZHANG H, LI L, DONG Q, et al. Activation of PKA/CREB signaling is involved in BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(2): 548-562.

[16] 周强. 左归丸对骨质疏松症大鼠骨、肾、下丘脑 GPR48、CREB、BMP9 影响的实验研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2016.

[17] 周强, 孙鑫, 邓洋洋, 等. 左归丸对绝经后骨质疏松症大鼠骨组织中 GPR48、CREB 表达影响的实验研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2015, 42(9): 1782-1784.

[18] Louvi A, Artavanis-Tsakonas S. Notch and disease: a growing field[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, 23(4): 473-480.

[19] Gururharsha K, Kankel M, Artavanis-Tsakonas S. The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway[J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(9): 654-666.

[20] Penton A, Leonard L, Spinner N. Notch signaling in human development and disease[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, 23(4): 450-457.

[21] Andersson E, Sandberg R, Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function[J]. *Development*, 2011, 138(17): 3593-3612.

[22] Tao J, Chen S, Lee B. Alteration of Notch signaling in skeletal development and disease[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1192(1): 257-268.

[23] LI R, ZHANG W, CUI J, et al. Targeting BMP9-promoted human osteosarcoma growth by inactivation of notch signaling[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2014, 14(3): 274-285.

[24] Sharff K, SONG W, LUO X, et al. Hey1 basic helix-loop-helix protein plays an important role in mediating BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal

- progenitor cells [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (1): 649-659.
- [25] LIAO J, WEI Q, ZOU Y, et al. Notch signaling augments BMP9-induced bone formation by promoting the osteogenesis-angiogenesis coupling process in mesenchymal stem cells (MSCs) [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(5): 1905-1923.
- [26] LIAO J, YU X, HU X, et al. lncRNA H19 mediates BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) through Notch signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(32): 53581-53601.
- [27] 周强, 孙鑫, 邓洋洋, 等. 左归丸对去卵巢致绝经后骨质疏松症大鼠骨组织中 Notch1、BMP9 表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(7): 2782-2784.
- [28] 孙鑫. 左、右归丸对绝经后骨质疏松症大鼠 Notch 信号通路调节机制的比较研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2015.
- [29] Kim S K, Barron L, Hinck C S, et al. An engineered transforming growth factor- β (TGF- β) monomer that functions as a dominant negative to block TGF- β signaling [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292 (17): 7173-7188.
- [30] MENG X, Nikolic-Paterson D, LAN H. TGF- β : the master regulator of fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(6): 325-338.
- [31] XU P, LIU J, Derynck R. Post-translational regulation of TGF- β receptor and Smad signaling [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(14): 1871-1884.
- [32] 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.
- [33] 唐欢, 许海甲, 侯煜东, 等. Runx2 基因对骨代谢调控的研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(12): 1501-1505.
- [34] 王小娜, 李正, 王瑒, 等. TGF- β_1 在雷奈酸锶促进大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(12): 2357-2361.
- [35] Arumugam B, Vairamani M, Partridge N, et al. Characterization of Runx2 phosphorylation sites required for TGF- β_1 -mediated stimulation of matrix metalloproteinase-13 expression in osteoblastic cells [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(2): 1082-1094.
- [36] Daneault A, Prawitt J, Fabien Soulé V, et al. Biological effect of hydrolyzed collagen on bone metabolism [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57(9): 1922-1937.
- [37] JIA S, LI W, LIU X, et al. Transforming growth factor- β_1 induces differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into myofibroblasts via production of reactive oxygen species [J]. *J Peking Univer Health Sci*, 2015, 47(5): 737-742.
- [38] ZHOU J, TANG W, FENG Y, et al. Angiotensin-(1-7) decreases the expression of collagen I via TGF- β_1 /Smad2/3 and subsequently inhibits fibroblast-myofibroblast transition [J]. *Clin Sci*, 2016, 130(21): 1983-1991.
- [39] Janani C, Kumari B D R. PPAR gamma gene-a review [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2015, 9(1): 46-50.
- [40] GE C, ZHAO G, LI B, et al. Genetic inhibition of PPAR γ S112 phosphorylation reduces bone formation and stimulates marrow adipogenesis [J]. *Bone*, 2018, doi: 10.1016/j.bone.2017.10.023.
- [41] FENG X, LIU X, CAI X, et al. The influence of tetracycline inducible targeting rat PPAR γ gene silencing on the osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22 (41): 6330-6338.
- [42] LI Z, PIAO C, SUN H, et al. Asiatic acid inhibits adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 68(2): 437-442.
- [43] WANG J, LI S, WANG T, et al. Isoprosalen-mediated suppression of bone marrow adiposity and attenuation of the adipogenic commitment of bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39 (3): 527-538.
- [44] 吕海波. 左归丸对去卵巢大鼠骨组织中 TGF- β_1 、Smad4 信号转导通路的研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2011.
- [45] YIN H, WANG S, ZHANG Y, et al. Zuoguiwan improves the dexamethasone-induced osteoporosis progression in zebrafish larvae [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 97: 995-999.
- [46] 曲宁宁, 任艳玲, 孙月娇, 等. 左归丸防治去卵巢骨质疏松模型大鼠骨流失的实验研究 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(2): 257-260.
- [47] 任艳玲, 李娅玲, 吕海波, 等. 左归丸对去卵巢骨质疏松大鼠肾脏 TGF- β_1 /Smad4 mRNA 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(10): 190-194.
- [48] 孟玥, 任艳玲, 艾思羽, 等. 左、右归丸及其拆方对去卵巢大鼠肾脏 TGF β_1 /Smad1 表达的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43 (9): 1981-1983.
- [49] 李娅玲. 左归丸对 PMOP 大鼠肾组织中 TGF- β_1 /Smad4 信号转导通路的实验研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2010.
- [50] 曲宁宁. 左归丸抗去卵巢大鼠骨质疏松症物质基础及作用机制研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2016.

- [51] Galli C, Passeri G, Macaluso G. Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation [J]. *J Dent Res*, 2010, 89(4): 331-343.
- [52] Stavros S. Wnt signaling and osteoporosis [J]. *Maturitas*, 2014, 78(3): 233-237.
- [53] DUAN P, Bonewald L F. The role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 77 (Pt A):23-29.
- [54] ZHANG Z, XIANG L, BAI D, et al. The protective effect of *Rhizoma Dioscoreae* extract against alveolar bone loss in ovariectomized rats via regulating Wnt and p38 MAPK signaling [J]. *Nutrients*, 2014, 6 (12): 5853-5870.
- [55] Alenazi F S, Ibrahim B A, Briski K P. Estradiol regulates dorsal vagal complex signal transduction pathway transcriptional reactivity to the AMPK activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-riboside (AICAR) [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 56(4):1-10.
- [56] LIU M, LI Y, PAN J, et al. Effects of Zuogui Pill (左归丸) on Wnt signal transduction in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *J Tradit Chin Med*, 2011, 31(2): 98-102.
- [57] 付小卫. 基于破骨细胞和成骨细胞调控通路探讨左、右归丸对不同性别去势大鼠骨质疏松症的作用差异及其机制 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2014.
- [58] 章建华, 邢婧, 范连霞, 等. 骨质疏松肾虚和肾阴虚证型下左归丸含药血清干预成骨细胞 ERK1/2, Wnt/ β -catenin 信号通路的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(20): 3983-3989.
- [59] YANG S, Sharrocks A, Whitmarsh A. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation [J]. *Gene*, 2013, 513(1): 1-13.
- [60] XU D J, ZHAO Y Z, WANG J, et al. Smads, p38 and ERK1/2 are involved in BMP9-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells [J]. *BMB Rep*, 2012, 45(4):247-252.
- [61] ZHANG P, DAI Q, OUYANG N, et al. Mechanical strain promotes osteogenesis of BMSCs from ovariectomized rats via the ERK1/2 but not p38 or JNK-MAPK signaling pathways [J]. *Curr Mol Med*, 2015, 15 (8): 780-789.
- [62] 蒿长英, 任艳玲, 刘立萍, 等. 左归丸含药血清通过 ERK/TGF- β /Smads 信号级联调控 MC3T3-E1 细胞增殖与分化 [J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28 (9): 1670-1675.
- [63] 蒿长英, 任艳玲, 赵金茹. 左归丸含药血清通过 ERK/Smads 信号通路干预 MC3T3-E1 细胞的功能基因表达 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28 (6): 872-876.
- [64] 何丽娟. 左、右归丸及其拆方干预去卵巢大鼠 BMSCs 成骨诱导的实验研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2015.
- [65] Cuadrado A, Nebreda A. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling [J]. *Biochem J*, 2010, 429(3): 403-417.
- [66] 刘立萍, 李然, 任艳玲, 等. 左归丸通过 p38 MAPK 信号通路刺激 MC3T3 细胞核结合因子表达 (英文) [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(5): 1457-1461.

[责任编辑 张丰丰]