

# 动物骨代谢相关信号通路研究进展

赵净颖<sup>1</sup>, 段小花<sup>1,2</sup>, 王秋婷<sup>1</sup>, 黄英<sup>1</sup>, 贾俊静<sup>1</sup>, 豆腾飞<sup>1</sup>

1. 云南农业大学动物科学技术学院, 昆明 650201

2. 云南中医学院, 昆明 650500

**摘要:** 骨骼是组成脊椎动物内骨骼的坚硬器官, 对机体起着运动、支撑和保护的作用。骨骼处于骨形成和骨吸收两种活动所组成的骨代谢的动态平衡状态, 这种平衡对于维持骨量和矿物质稳态至关重要。在动物骨代谢过程中, 存在着众多调节骨形成和骨吸收的信号通路, 如 BMP (bone morphogenetic protein)/SMADs、TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ )、Wnt/ $\beta$ -catenin、OPG (osteoprotegerin)/RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand)/RANK (receptor activator of NF- $\kappa$ B)、FGF (fibroblast growth factor) 和 Notch 信号通路等。这些信号通路具有复杂的调控机制, 参与骨代谢过程的调节。本文综述了在动物骨代谢过程中起关键调节作用的相关信号通路的作用机制及研究进展, 以期为动物骨代谢研究奠定基础。

**关键词:** 骨代谢; 信号通路; 骨形成; 骨吸收

## Progress on signal pathways related to bone metabolism in animals

Jingying Zhao<sup>1</sup>, Xiaohua Duan<sup>1,2</sup>, Qiuting Wang<sup>1</sup>, Ying Huang<sup>1</sup>, Junjing Jia<sup>1</sup>, Tengfei Dou<sup>1</sup>

1. Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

2. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China

**Abstract:** Bone is a hard organ that makes up vertebrate endoskeleton, which plays a role in movement, support and protection for the body. The normal growth and development of bone is in the dynamic balance of bone metabolism, which is composed of bone formation and bone absorption. This balance is very important for maintaining bone mass and mineral homeostasis. In the process of bone growth and metabolism, there are many signaling pathways regulating bone formation and absorption, such as BMP (bone morphogenetic protein)/SMADs, TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), Wnt/ $\beta$ -catenin, OPG (osteoprotegerin)/RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand)/RANK (receptor activator of NF- $\kappa$ B), FGF (fibroblast growth factor) and Notch signaling pathway. These

收稿日期: 2020-03-11; 修回日期: 2020-06-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: U1702232), 云南省创新团队项目(编号: 2019HC011), 云南省科技厅南希·莱恩院士工作站项目(编号: 2017IC048), 云岭产业技术领军人才培养和云南省博士研究生学术新人奖资助[Supported by National Natural Science Foundation of China (No. U1702232), Yunnan Innovation Team Project (No. 2019HC011), Nancy Lane Academician Workstation Project of Yunnan Science and Technology Department (No. 2017IC048), Yunling Industrial Technology Leader Training, and New Academic Award for Doctoral Candidates in Yunnan Province.]

作者简介: 赵净颖, 在读硕士研究生, 专业方向: 动物营养与饲料科学。E-mail: 1849680658@qq.com

通讯作者: 豆腾飞, 讲师, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: tengfeidou@sina.com

DOI: 10.16288/j.ycz.20-066

网络出版时间: 2020/7/30 9:38:52

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20200728.1634.001.html>

signaling pathways have complex regulatory mechanisms and are involved in the regulation of bone metabolism. In this review, we summarize the mechanism and research progress of signal pathways that play key regulatory roles in the process of animal bone metabolism, thereby laying a foundation for research in animal bone metabolism.

**Keywords:** bone metabolism; signaling pathway; bone formation; bone resorption

骨骼是脊椎动物机体重要的刚性组织, 主要由磷酸钙矿物质和 I 型胶原组成, 对动物机体起到支撑、保护以及运动等作用。骨骼系统的发育和维持受遗传及环境等因素的影响<sup>[1]</sup>, 其中遗传因素是影响骨骼系统发育的重要因素, 其对骨骼生长发育的影响在动物的整个生命过程中均有体现, 包括骨相关信号通路调控机制、基因作用的发育时机、骨相关基因产物的表观遗传修饰等<sup>[2]</sup>。

骨骼发育过程包括膜内骨化和软骨内骨化两种方式<sup>[3]</sup>。在膜内骨化过程中, 间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)直接分化成成骨细胞(osteoblast, OB)。膜内骨化主要发生在颅顶骨部位。在软骨内骨化过程中, 间充质干细胞发生增殖分化形成软骨, 随后被矿化骨所取代。软骨内骨化发生在颅底和颅骨后部、轴向骨和四肢骨。发育结束进入稳态维持的骨骼处于骨形成和骨吸收所组成的骨代谢动态平衡状态, 其中骨形成过程是由 MSC 衍生的 OB 介导, 骨吸收过程是由造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)衍生的破骨细胞(osteoclast, OC)介导。骨吸收与骨形成之间的平衡对于维持骨量和维持全身矿物质稳态至关重要, 因此可以保持骨骼健康。一旦这种平衡状态被破坏, 骨骼便会处于病理状态, 也称骨代谢性疾病, 如高破骨细胞活性或低成骨细胞活性导致的低骨量(骨质减少), 以及低破骨细胞活性或高成骨细胞活性导致的高骨量(骨硬化)<sup>[4]</sup>。

在动物骨骼生长发育和骨代谢过程中, 存在着生长因子、细胞因子、酶等众多调控因子, 而这些调控因子通过相关的信号通路参与骨形成和骨吸收过程, 如 BMP (bone morphogenetic protein)/Smads、TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ )、Wnt/ $\beta$ -catenin、OPG (osteoprotegerin)/RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand)/RANK (receptor activator of NF- $\kappa$ B)、FGF (fibroblast growth factor)和 Notch 信号通路等。其中, BMP/Smads 信号通路影响成骨细胞分化及骨形成, TGF- $\beta$  信号通路参与调控成骨过程中细胞的

活动和代谢, Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路调控骨代谢的平衡, OPG/RANKL/RANK 信号通路可以维持骨骼稳态, FGF 信号通路和 Notch 信号通路参与成骨细胞分化。本文介绍了参与动物骨代谢的信号通路相关研究进展, 阐明这些信号通路在调节骨形成和骨吸收方面的作用机制, 可以为临床有效防治骨异常性疾病提供理论依据。

## 1 影响动物骨代谢的关键信号通路

动物骨代谢的调控是一个非常复杂的过程, 有众多的调节因子及信号途径参与。这些途径各自具有复杂的调控机制, 单独或共同参与动物骨代谢的调控。近年来众多研究表明, 动物骨代谢的平衡主要由 BMP/Smads、TGF- $\beta$ 、Wnt/ $\beta$ -catenin、OPG/RANKL/RANK 和 FGF 等多条关键信号通路参与调控。

### 1.1 BMP/Smads 信号通路

在骨骼发育过程中, 多条信号通路参与调节成骨与破骨过程的平衡, 而最早发现和确认的最重要的一条通路是影响成骨细胞分化及骨形成的关键信号通路——BMP/Smads 信号通路<sup>[5,6]</sup>。

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMPs)是转化生长因子  $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )超家族的成员, 是骨骼发育的重要生长因子, 具有增强骨髓干细胞向成骨细胞分化的能力, 从而促进骨骼的生长发育<sup>[5]</sup>。在已发现的 20 余种亚型中, BMP2、4、5、6、7、9 等均对成骨细胞分化有调节作用<sup>[6-8]</sup>。其中 BMP2 因具有增强骨形成及代谢的作用而成为研究热点。BMP2 能够诱导间充质干细胞的增殖、迁移以及向成骨细胞的分化<sup>[8,9]</sup>, 且能够协同其他成骨因子共同刺激成骨细胞增殖, 增强成骨细胞活性, 加速骨重建<sup>[10]</sup>。

BMP/Smads 信号通路由 BMPs 及其受体、Smad 蛋白和相关转录因子组成。BMP2 通过自分泌或旁

分泌形式释放后,其单体可通过二硫键连接形成二聚体,再结合 BMPs 受体。BMPs 受体是丝氨酸/苏氨酸激酶受体,包括 I 型受体(BMPR-IA、BMPR-IB 和 ACVR-1)和 II 型受体(BMPR-II、ActR-IIA 和 ActR-IIB)<sup>[11]</sup>。BMP2 先结合 BMPR-II,发生自身磷酸化而被激活,继而磷酸化 BMPR-I,使 BMPR-I 激活<sup>[12~14]</sup>,下游 Smads 信号 Smad1/5/8 被 BMPR-I 受体激活并和受体形成短暂复合物,使其与 Smad4 结合,转移至核内,转录激活成骨分化基因,如上调核心结合蛋白因子 2 (*Runx2*)<sup>[15,16]</sup>、成骨细胞特异性转录因子 *Osterix (OSX)*<sup>[17]</sup>和同源盒基因 *HoxC-8*<sup>[18]</sup>等,促进成骨细胞分化。而 Smad6 和 Smad7 则参与了骨形态发生蛋白信号传导的负调控<sup>[19]</sup>。

Dallari 等<sup>[20]</sup>和 Yang 等<sup>[21]</sup>在人类骨骼疾病的临床研究发现骨质疏松性骨折患者常伴有碱性磷酸酶活性下降的现象,而导致碱性磷酸酶活性下降的重要原因是 BMP2 等成骨基因表达不足,并且存在抑制软骨细胞向成骨细胞的分化并伴有成骨细胞凋亡的增加现象。Zappitelli 等<sup>[22]</sup>在小鼠(*Mus musculus*)细胞实验中的研究显示,上调 BMP2/4 基因的表达可提高成骨细胞特定标志物的表达。Li 等<sup>[19]</sup>和 Zarrinkalam 等<sup>[23]</sup>在山羊(*Capra hircus*)的活体实验研究中发现,注射人重组的 BMP2 可提高骨密度,并可以治疗骨质疏松山羊腰椎骨缺损处; Cipitria 等<sup>[24]</sup>研究表明注射人重组的 BMP7 可提高山羊胫骨的韧性和强度。Mizrahi 等<sup>[25]</sup>在猪(*Capra hircus*)的间充质干细胞研究中发现,人重组的 BMP6 比 BMP2 更加有效地诱导成骨分化,促进骨骼的形成。在 BMP2/Smads 信号通路中,存在众多的相关调控因子。研究发现,泛素化调节因子(Smurf)与 BMP2 激活的 Smad1、Smad5 相互作用并调节成骨细胞特异性转录因子 *Runx2* 降解<sup>[26]</sup>,并且 Smad6 与 Smurf 的协同作用可下调 *Runx2* 蛋白水平,负向调控 BMP/Smads 信号通路<sup>[27]</sup>。而 I 型多发性内分泌腺瘤肿瘤抑制基因产物(Menin)可增强 BMP2 诱导的 *Smad1/5*、*Runx2* 的转录活性。胶原三股螺旋重复蛋白 1 (collagen triple helix repeat containing 1, *Cthrc1*)可正向调节 OB 骨形成,从而使骨量增加。Takeshita 等<sup>[28]</sup>研究发现,缺失 *Cthrc1* 的小鼠在生长初期,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和骨钙素(bone gamma-carboxyglutamic-acid-containing proteins, BGP)表达

减少。对猪和羊的研究发现, *Noggin* 基因是 BMPs 的拮抗剂,可调节 BMPs 对骨骼的作用,调节骨生长发育的重要细胞因子<sup>[29,30]</sup>。

除 BMP/Smads 信号通路相关调控因子以外,一些外在因素也可通过调节 BMP/Smads 信号通路来促进动物骨骼的生长发育。Feng 等<sup>[31]</sup>对大鼠(*Rattus norvegicus*)细胞的研究显示,辛伐他汀(simvastatin)可促进骨质疏松症(osteoporosis, OP)大鼠的关键成骨分化相关因子 *Runx2*, 骨保护素(osteoprotegerin, OPG), 骨桥蛋白(osteopontin, OPN)和 *OSX* 的 mRNA 表达水平升高,可以通过 BMP/Smads 信号通路促进 OP 大鼠模型中 MSCs 向 OB 分化。Chai 等<sup>[32]</sup>在去卵巢大鼠的研究中发现,传统中药配方骨疏康处理组通过上调 BMP2, 磷酸化 Smad1 和磷酸化 Smad5 (p-Smad1/5), 升高 *Osterix* 和 *Runx2* 的表达来显著增强 BMP/Smads 信号通路,促进骨形成。Yu 等<sup>[33]</sup>研究显示,大豆(*Glycine max*)苷元通过激活 BMP/Smads 途径促进成骨细胞增殖和分化,具体表现为上调 *ALP*、*Runx2*、*Smad1* 基因的表达以及 *Runx2* 和 *Smad1* 蛋白的表达。可见, BMP/Smads 信号通路的激活可以促进动物成骨细胞的增殖、分化及骨形成。

## 1.2 TGF- $\beta$ 信号通路

骨骼中 TGF- $\beta$  家族成员参与了整个成骨过程中细胞活动和代谢的调控。TGF- $\beta$  家族由 3 种亚型组成: TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 和 TGF- $\beta$ 3<sup>[34]</sup>, 均在骨中表达。TGF- $\beta$  与其结合蛋白(LTBP)结合形成复合物,由 OB 分泌,可以与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分(纤维连接蛋白、纤颤蛋白 1 和整合素等)相互作用,增强成骨细胞分化,促进骨骼发育<sup>[35]</sup>。Dünker 等<sup>[36]</sup>研究表明, *TGF- $\beta$ 2*<sup>-/-</sup>和 *TGF- $\beta$ 3*<sup>-/-</sup>双基因敲除小鼠远端部分骨量丢失,特别是 *TGF- $\beta$ 2* 缺失的小鼠在膜内和软骨内骨化方面表现出严重的骨骼异常。

在骨基质合成终止后,成骨细胞发生凋亡或分化为骨细胞(骨衬细胞)。成熟的 TGF- $\beta$  通过阻止成骨细胞凋亡来调控成骨细胞的存活。骨髓巨噬细胞是破骨细胞的前体,而 TGF- $\beta$  直接作用于骨髓巨噬细胞,促进破骨细胞生成。Yasui 等<sup>[37]</sup>研究表明, TGF- $\beta$  诱导 Smad2/3 与泛素连接酶 TRAF6 (TNF receptor associated factor 6)之间的分子相互作用,对于 RANKL 诱导的破骨细胞信号通路至关重要。此

外,成骨细胞可产生 *RANKL* 和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, *M-CSF*)。因此, *TGF- $\beta$*  对破骨细胞的作用也来源于成骨细胞。*TGF- $\beta$*  刺激成骨细胞不仅表达 I 型胶原、ALP、BGP 等成骨功能蛋白,还表达 *M-CSF*、*RANKL*、*OPG* 等破骨细胞调控基因<sup>[38]</sup>。*TGF- $\beta$*  对破骨细胞生成的影响与剂量有关,低剂量 *TGF- $\beta$*  通过增加 *M-CSF* 的表达和前列腺素的产生,以及 *RANKL* 与 *OPG* 的比值来增强破骨细胞的生成<sup>[39]</sup>,而高浓度 *TGF- $\beta$*  则通过增加 *OPG* 的表达来抑制 *M-CSF* 和 *RANKL* 的表达<sup>[40]</sup>。由于 *OPG* 是 *RANKL* 的高亲和力配体,是成骨细胞产生的 *RANKL* 的可溶性抑制剂,因此 *TGF- $\beta$*  对成骨细胞介导的破骨细胞的作用可能是骨重建的负反馈作用。

Shi 等<sup>[41]</sup>研究发现,用 *TGF- $\beta$*  信号抑制剂 SB431542 处理的骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC),移植到猪上颌骨缺损处,可以促进成骨分化增加,成功修复小型猪严重的颌面部骨缺损。Zeng 等<sup>[42]</sup>通过细胞实验发现 miR-23a 簇(miR-23a-24-2-27a 簇)通过靶向 *TGF- $\beta$*  途径的负调节剂 *Prdm16* 来调节 *TGF- $\beta$*  信号通路,从而促进小鼠骨细胞的分化。Xu 等<sup>[43]</sup>研究表明,系统或局部阻断软骨中 *TGF- $\beta$*  活性可减轻类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)关节软骨退变,表明软骨中 *TGF- $\beta$*  的异常激活与 RA 关节软骨退变的发生有关。可见, *TGF- $\beta$*  对动物成骨分化起着负反馈作用。

### 1.3 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路

Wnt 信号通路已成为骨代谢平衡的关键调控信号通路<sup>[44]</sup>。Wnt 信号控制胚胎发育和细胞增殖、分化、迁移等多个过程。 $\beta$ -catenin 是调控 Wnt 信号的必要调控因子。一旦 Wnt 蛋白与 Frizzled 受体、低密度脂蛋白相关蛋白受体(Lrp5 或 Lrp6)结合,  $\beta$ -catenin 将逃脱降解机制,转移到细胞核并与转录调节因子 Tcf/Lef 相互作用,激活 Wnt 靶基因的转录。在骨质疏松/高骨密度综合征中, Lrp5 的功能发生缺陷<sup>[45,46]</sup>。 $\beta$ -catenin 信号对成骨细胞发挥细胞环境相关的功能取决于分化的阶段。在早期阶段,  $\beta$ -catenin 在前成骨细胞中失活,导致成骨细胞分化受阻,从而致使骨骼中缺乏成熟的成骨细胞<sup>[47-50]</sup>。然而,在后期阶段,  $\beta$ -catenin 在成熟的成骨细胞和骨细胞中

失活并不影响成骨细胞分化和骨形成,而是通过增加破骨细胞分化和骨吸收导致骨量降低<sup>[51-53]</sup>。在 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路中,甲状腺激素和机械负荷等因素可下调骨细胞中 *Sost* 基因并增强  $\beta$ -catenin 信号<sup>[54-56]</sup>。*Sost* 编码硬化蛋白,是一种有效的骨形成抑制剂,通过与 Lrp5/6 结合来拮抗 Wnt 信号,而硬化蛋白表达的缺失是导致高骨量疾病范·巴克病(van Buchem)和硬化性骨化病的原因<sup>[57,58]</sup>。因此, Wnt 信号的激活对动物骨代谢的调节起重要作用。

Tu 等<sup>[43]</sup>研究表明,激活  $\beta$ -catenin 的小鼠表现出四肢骨骼骨矿物质密度增加,骨小梁数量、骨松质密度、骨形成标记物显著增加,且骨膜骨形成率明显升高;骨骼中 Wnt 信号靶向基因、成骨细胞和骨细胞标记、原骨细胞因子和抗破骨细胞因子含量升高。因此,激活骨细胞中的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号可增加成骨细胞的增殖、分化,从而促进骨量增加。可见,  $\beta$ -catenin 可激活骨细胞和成骨细胞等骨细胞的合成代谢是骨骼中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号促进骨形成的重要原因。Wang 等<sup>[59]</sup>研究发现,脂联素(adiponectin)转基因的 BMSCs 中的  $\beta$ -catenin 和细胞周期蛋白 D1(*cyclinD1*)基因及其蛋白表达水平较高,且脂联素治疗组小鼠观察到更多新骨形成,表明脂联素可促进 BMSCs 成骨分化和成骨,而 Wnt/ $\beta$ -catenin 途径参与脂联素的成骨作用。Zhu 等<sup>[60]</sup>在体外培养的 BMSCs 中发现,梓醇(catalpol)可显著增强成骨细胞特异性基因表达、碱性磷酸酶活性和钙沉积,可通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 途径促进 BMSCs 的成骨分化。Molagoda 等<sup>[61]</sup>发现太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)提取物可以在斑马鱼(*Brachydanio rerio* var)中通过诱导 Wnt/ $\beta$ -catenin 途径来促进幼体骨矿化及尾鳍再生。因此,在动物骨骼生长发育中可通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路来促进成骨分化,促进骨量增加。

### 1.4 OPG/RANKL/RANK 信号通路

骨转换(bone turnover)取决于成骨细胞的骨形成和破骨细胞的骨吸收之间的平衡。骨量丢失和骨质疏松症的发生是骨吸收大于骨形成导致的。OPG、细胞核因子- $\kappa$ B 受体活化因子(RANK)和 RANK 配体(RANKL)是偶联成骨细胞、基质细胞和破骨细胞分化、活化及生物活性的 3 种主要细胞因子, OPG/RANKL/RANK 信号通路是破骨细胞生物学的基础,



在骨代谢中起十分重要的作用<sup>[62]</sup>。大量研究表明, 人类及动物代谢性骨病与这一系统的改变有关<sup>[63~65]</sup>。

OPG 是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)受体家族成员, 又称破骨细胞生成抑制因子或 TNF 受体样分子, 是一种通过抑制破骨细胞分化和活化来调节骨量的分泌蛋白。RANKL 是肿瘤坏死因子超家族的一员, 已被证明既能介导破骨细胞生成, 又能激活成熟破骨细胞。RANK 是 RANKL 的受体, 结合 RANKL 发挥生物学功能。在骨组织中, RANKL 由多种细胞表达, 包括成骨细胞、骨细胞和免疫细胞, 尤其在成骨细胞和骨细胞中的表达较高<sup>[66]</sup>。RANKL 结合并激活其位于破骨细胞祖细胞和成熟破骨细胞上的受体 RANK。RANK 刺激导致前破骨细胞分化为活性破骨细胞, 活性破骨细胞重新吸收矿化骨基质。RANKL 的活化优先表达于成骨前细胞的细胞膜上, 而其特异性受体 RANK 则表达于破骨细胞前体细胞的细胞膜上。RANKL 与 RANK 的结合导致破骨前细胞分化、形成、融合和存活<sup>[67]</sup>。RANK-RANKL 相互作用是破骨细胞形成的必要条件。

研究表明, 缺失 RANKL 的动物在缺乏骨基质或成骨细胞的情况下, 无法产生破骨细胞, 而提供外源性 RANKL 可刺激体外破骨细胞生成<sup>[68]</sup>。基质细胞和包括成骨细胞系在内的其他类型细胞分泌的 OPG, 可竞争性地结合 RANKL, 阻断 RANK 对破骨细胞的作用, 进而抑制破骨细胞的活化, 进而抑制破骨和骨溶解。过表达 OPG 的小鼠导致严重骨丢失和成熟破骨细胞减少实验, 表明 OPG 可作为破骨细胞生成抑制剂<sup>[69]</sup>, 而 RANKL 缺失的小鼠表现出严重的骨丢失, 并且由于不能支持破骨细胞的生成而完全缺乏破骨细胞<sup>[70]</sup>。然而, Liu 等<sup>[71]</sup>研究表明敲除 OPG 的小鼠骨质疏松, 骨密度降低, 骨折发生率高, 通过静脉注射重组 OPG 蛋白可逆转其病理。因此, OPG 的存在对维持正常骨量是绝对必要的。另外, 有研究表明, 作为破骨生成促进因子的 RANKL 和破骨生成抑制因子的 OPG 表达水平的平衡决定了骨吸收的程度, RANKL 上调和 OPG 下调都会导致骨质流失<sup>[72]</sup>, 且 OPG/RANKL 比值的失衡可能导致骨量的丢失<sup>[73]</sup>。

Huang 等<sup>[74]</sup>对家鸡(*Gallus gallus*)的研究表明, OPG/RANKL 平衡的破坏导致骨形成改变, 引起鸡胫骨结构改变、胫骨质量降低, 导致胫骨软骨发育

不良。血清中 OPG 水平、Ca<sup>2+</sup>浓度和 ALP 活性均显著降低, 进一步证实了骨代谢受到抑制。Wu 等<sup>[75]</sup>通过人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 共培养系统的研究结果表明, 与未经处理的共培养物相比, 马钱子碱(brucine)处理显著提高了共培养物中 OPG/RANKL mRNA 表达比率和 OPG/RANKL 蛋白比率, 说明马钱子碱可通过调节成骨细胞中 OPG 和 RANKL 的表达和分泌来间接控制破骨细胞, 从而抑制破骨细胞的分化和骨吸收功能。Hou 等<sup>[76]</sup>将雌性 Sprague-Dawley 大鼠进行卵巢切除术, 分别用 10、100、1000 和 2000 mg/kg/d 等剂量的乳铁蛋白(lactoferrin, LF)进行口服治疗, 饲喂 6 个月后发现, LF 剂量依赖性地增加了 Ovx 大鼠骨体积、骨小梁厚度和骨小梁数目, 减少了骨小梁分离; 此外, 与未经处理的 Ovx 大鼠相比, 更高剂量的 LF (1000 mg/kg/d 和 2000 mg/kg/d)显著增加了骨密度, 且总体上 LF 处理显著提高了 Ovx 大鼠 OPG mRNA 水平, 抑制了 RANKL mRNA 水平; 这些结果表明, 口服 LF 可保留骨质并改善骨骼的微结构, 且 LF 可能通过 OPG/RANKL/RANK 途径的调节来增强骨形成, 减少骨吸收及骨质流失。据 Ma 等<sup>[77]</sup>发现 220 mg/kg 或 440 mg/kg 的 1,6-二磷酸果糖锶(FDP-Sr)治疗能显著提高 Ovx 大鼠的骨密度, 改善骨微结构和骨强度, 且用 FDP-Sr 治疗以剂量依赖性方式降低了血清中 RANKL 水平, 增加了 OPG 水平, 也显著下调了骨髓中的 RANKL 表达和上调了 OPG 表达, 结果表明, FDP-Sr 对绝经后骨质疏松症的有效治疗, 其部分作用是通过 OPG-RANKL-RANK 途径减少破骨细胞的生成完成。可见, OPG/RANKL 的比值可调节骨吸收, OPG-RANK-RANKL 信号通路在调节动物骨形成和骨吸收的过程中起着至关重要的作用。

## 1.5 FGF 信号通路

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)信号通路已被证实在调节成骨细胞和成纤维细胞的增殖和分化、成骨以及许多其他重要的细胞过程中发挥着重要的作用, 包括血管生成和伤口愈合<sup>[78]</sup>。此外, FGF 信号通路在调节骨祖细胞膜内和软骨内骨化的信号传递过程中发挥着至关重要的作用<sup>[79]</sup>。由于 FGF 通路对成骨细胞分化的刺激作用以及对成骨细胞分化的抑制作用, 表明 FGF 信号通路对成骨

细胞成熟过程的影响是阶段性的<sup>[80]</sup>,且颅骨和长骨生长异常多与 FGF 信号通路的突变有关<sup>[81]</sup>。

在 23 个 FGF 家族成员中,一些 FGF 在成骨过程中起着关键作用。例如,FGF2 磷酸化激活 Runx2,可影响骨形成<sup>[82]</sup>。此外,已有研究表明 FGFR2 (FGF receptor 2) 也参与了骨生长的正向调控和成骨细胞的合成代谢功能<sup>[83]</sup>。FGFR3 可通过调节成骨细胞分化来影响骨骼的骨密度和皮质骨厚度<sup>[84]</sup>。FGF9 和 FGF18 的表达也显著影响胚胎骨形成<sup>[85]</sup>。

Kanda 等<sup>[86]</sup>发现大鼠骨髓细胞在含碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)培养基中培养后,细胞数量显著增加,细胞膨胀,BMP2 和骨桥蛋白表达明显增加。Furuya 等<sup>[87]</sup>研究发现水凝胶 bFGF 治疗骨折缺损后,小鼠骨密度较高,骨矿化率较高,Runx2 和 BGP 基因表达上调。D'mello 等<sup>[88]</sup>研究表明,转染编码 FGF2 蛋白(PEI-pFGF2)的聚乙烯亚胺纳米复合物(nanoplexes)的骨髓基质细胞(BMSCs)中的 FGF2 基因高表达。Khorsand 等<sup>[89]</sup>在糖尿病兔(*Leporidae*)模型中也开发了相同的 nanoplex,用于将 FGF2 和 BMP2 蛋白递送到缺陷部位。结果表明,与单纯植入胶原支架的 PEI-pBMP2 相比,植入胶原支架内的 PEI-(pBMP2 + pFGF2)可显著改善骨再生。据 Charles 等<sup>[90]</sup>报道,在颅骨缺损的年老鼠鼠中,向 BMP2 中添加 FGF2 联合治疗后,小鼠骨缺损中心区域的骨填充增强,且骨体积增加。该研究表明,相对于单独的 BMP2 或 FGF2,低剂量 FGF2 和低剂量 BMP2 联合应用有可能增加老年小鼠的骨愈合能力。这些结果表明 BMP2 和 FGF2 协同作用可促进骨修复。Yuan 等<sup>[91]</sup>研究发现,单独的 BMP4/7 显著促进了 BMSCs 的增殖,同时,它也促进或抑制了 BMSCs 的成骨分化,而 BMP4/7 和 bFGF 的协同作用显著促进了 BMSCs 的增殖和成骨分化,协同作用的治疗取决于剂量和时间。BMP4/7 和 bFGF 的合理组合可以促进 BMSCs 的增殖和成骨分化。综上所述,BMP 和 FGF 协同作用对成骨过程的调节起重要作用。

## 1.6 其他骨代谢重要信号通路

### 1.6.1 Notch 信号通路

Notch 信号通路作为一种进化上高度保守的配

体受体信号通路,在细胞存活、增殖、分化以及发育过程中的命运决定、稳态等方面发挥着重要的机制作用<sup>[92]</sup>。Notch 信号通路在骨骼生长发育中起着对成骨细胞的直接诱导作用。而骨祖细胞中 Notch 信号通路受到抑制可导致骨髓源性间充质干细胞的损耗,并与各年龄段骨质流失有关<sup>[93,94]</sup>。Pan 等<sup>[95]</sup>研究发现,活化的 B 淋巴细胞通过激活 Notch 信号来抑制 BMSC 的成骨作用,当 B 淋巴细胞被灭活或 Notch 信号被抑制时,BMSC 的成骨作用将部分恢复。He 等<sup>[96]</sup>在小鼠细胞实验中发现,抑制 Notch1 减少了 BMSC 的增殖并促进其成骨分化。这些结果表明 Notch 信号通路在 BMSC 分化过程中受到抑制,说明 Notch 信号通路对 BMSC 成骨分化具有抑制作用。另一方面,Fukushima 等<sup>[97]</sup>研究发现,Notch 2 是破骨细胞重塑刺激物,它在破骨细胞分化过程中调节活化 T 细胞核因子 c1(NFAT-c1)的启动子并诱导破骨细胞形成。因此,Notch 信号在骨骼发育中起着不可或缺的作用。

### 1.6.2 Hedgehog 信号通路

Hedgehog(Hh)信号通路是调节骨骼发育的关键。目前在哺乳动物中已经确定了 3 种 Hh: Sonic Hh(Shh),Indian Hh(Ihh)和 Desert Hh(Dhh)<sup>[98]</sup>。其中,Ihh 是在发育中的骨骼内唯一发现的 Hh,Ihh 由软骨细胞分泌,调节软骨细胞的增殖和分化,对骨骼生长至关重要<sup>[99,100]</sup>。有研究发现,Hh 信号通路可能通过增加 Runx2 和 OSX 的表达来诱导 MSC 的成骨分化,并抑制 MSC 分化为脂肪细胞<sup>[101]</sup>。Zaman 等<sup>[102]</sup>研究显示,在内源性抗凋亡蛋白 humanin(HN)高表达小鼠、HN 处理的野生型小鼠和 HN 处理的培养小鼠跖骨中,糖皮质激素(glucocorticoid, GC)诱导的骨生长损伤和软骨细胞凋亡被阻止,HN 可通过靶向 Hh 途径使 GC 诱导的骨生长障碍受到抑制并恢复,而不会干扰 GC 所发挥的抗炎作用。可见,Hedgehog 信号通路在调节成骨细胞分化和骨骼发育中起重要作用。

### 1.6.3 PI3K/Akt 信号通路

PI3K/Akt 信号通路是一种重要的有丝分裂信号通路,在生长、存活、增殖和活性等多种细胞过程

中发挥着重要作用<sup>[103]</sup>。在骨骼生长发育中, PI3K 信号及其下游靶点在骨形成和骨重塑中起着重要调控功能<sup>[104]</sup>。Ke 等<sup>[105]</sup>研究表明, 川续断皂苷 VI (asperosaponin VI, ASA VI)促进了去卵巢小鼠 BMSC 的增殖, 增强了 ALP 活性, 并促进了钙结节的生成; 此外, ASA VI 增强了 ALP、BGP 和 Runx2 的表达, 而经 LY294002 (阻断 PI3K/Akt 信号通路的蛋白激酶抑制剂)处理则降低了以上成骨作用, 并降低了 ASA VI 诱导的 p-Akt (磷酸化 Akt)水平。这些结果表明, ASA VI 通过作用于 PI3K/Akt 信号通路来促进 Ovx 的 BMSC 的成骨分化。可见, 在动物骨骼生长发育中激活 PI3K/Akt 信号通路可促进 BMSC 的成骨分化。

#### 1.6.4 钙离子信号通路

钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )在骨骼中起着重要的结构作用, 且  $\text{Ca}^{2+}$  信号在成骨细胞分化过程中起着重要作用。在骨重塑过程中,  $\text{Ca}^{2+}$  作为矿物相的成分, 以游离离子的形式不断释放到细胞外环境中<sup>[106]</sup>。因此,  $\text{Ca}^{2+}$  持续可作用于成骨细胞和骨祖细胞发挥生物学功能。 $\text{Ca}^{2+}$  进入钙通道介导的细胞, Runx2 起中介作用, 激活磷脂酶 C (PLC) 和肌醇-1,4,5-三磷酸肌醇 (IP3) 信号<sup>[107]</sup>, 进而促进细胞内存储  $\text{Ca}^{2+}$  的释放, 从而促进骨骼的生长发育。细胞外钙敏感受体 (Calcium-Sensing Receptor, CaR) 是一种 G 蛋白偶联受体, 在调节细胞外钙稳态中起重要作用, Liu 等<sup>[108]</sup>研究表明, 高钙血症的减少在预防 CaR 缺陷 ( $\text{CaR}^{-/-}$ ) 小鼠的早期致死性中起关键作用, 且  $\text{CaR}^{-/-}$  小鼠软骨内骨形成缺陷是由于血清钙浓度显著升高、血清磷浓度和骨骼甲状旁腺激素相关蛋白水平降低所致。Chang 等<sup>[109]</sup>研究表明, 骨骼中 CaR 的缺失会导致严重的骨骼缺陷, 而软骨细胞 (软骨生成细胞) 中 CaR 的缺失导致胚胎第 13 天 (E13) 前死亡, 但在 E16~E18 之间诱导小鼠软骨细胞特异性缺失 CaR 是可行的, 但显示小鼠生长板发育延迟; 这些结果显示 CaR 在早期胚胎发生和骨骼发育中起着关键作用。综上所述, 钙离子受体敲除小鼠实验证明了钙离子信号对骨发育非常重要。

#### 1.6.5 Hippo 信号通路

Hippo 信号是调节器官大小和组织再生的主要

因素, 近年来的一些研究表明 Hippo 信号通路在调节骨形成方面发挥作用。Wang 等<sup>[110]</sup>通过体外实验研究表明, 小鼠 BMSCs 包括迁移和成骨的生物学功能与 Hippo 途径的关键下游效应物 YAP (Yes 相关蛋白) 的表达增强有关。Chen 等<sup>[111]</sup>发现, 在成骨培养条件下, BMSCs 中 Hippo 信号的激活抑制了成骨分化。Hippo 信号通路对于骨骼发育的具体调控机制还不明确, 还需开展更多的相关研究。

## 2 结语与展望

动物骨骼生长发育及骨代谢受 BMP/Smads、TGF- $\beta$ 、Wnt/ $\beta$ -catenin、OPG/RANKL/RANK 和 FGF 等多条关键信号通路调控, 这些信号通路通过直接或间接作用于 Runx2 或  $\beta$ -catenin 等关键转录因子而彼此相互联系、相互影响, 从而组成了复杂的调控网络 (骨代谢调控的关键信号通路图见图 1)。该网络协同参与了骨代谢过程的调控, 维持骨稳态。尽管目前对骨代谢相关信号通路的研究较多, 也取得了一些重要的研究成果, 但对于调控动物骨代谢的分子机制仍未阐明清晰。随着生命科学的不断发展, 在不远的将来能够解析骨代谢调控的完整分子机制, 只有理解了这些信号通路的分子作用机制, 并阐明这些信号通路传导途径之间的相互作用, 才能为动物病理性骨骼的治疗奠定基础。

此外, 本文介绍了中草药及其提取物可通过这些信号通路调节骨形成或骨吸收过程, 从而维持骨代谢的平衡。目前已有较多研究表明, 淫羊藿 (*Epimedium Folium*)、补骨脂 (*Psoralea corylifolia* Linn.)、当归 (*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels)、山药 (*Dioscorea opposita* Thunb.)、杜仲 (*Eucommia ulmoides*) 等单体及其提取物, 或是由多味单剂组成的方剂如更年春、密骨胶囊等均对动物骨骼的生长发育起作用, 说明中草药在防治动物病理性骨骼方面具有广阔的前景。但动物骨骼疾病的分子机制复杂, 中草药对于骨代谢相关信号通路的调控研究还处于初始阶段, 还需进一步深入研究。将中草药应用与动物骨骼发育和骨代谢的分子机制研究相结合, 不仅可以深入揭示中草药防治骨骼疾病的机制, 还能为动物骨骼疾病的防治提供依据, 使中草药的应用前景更广阔。



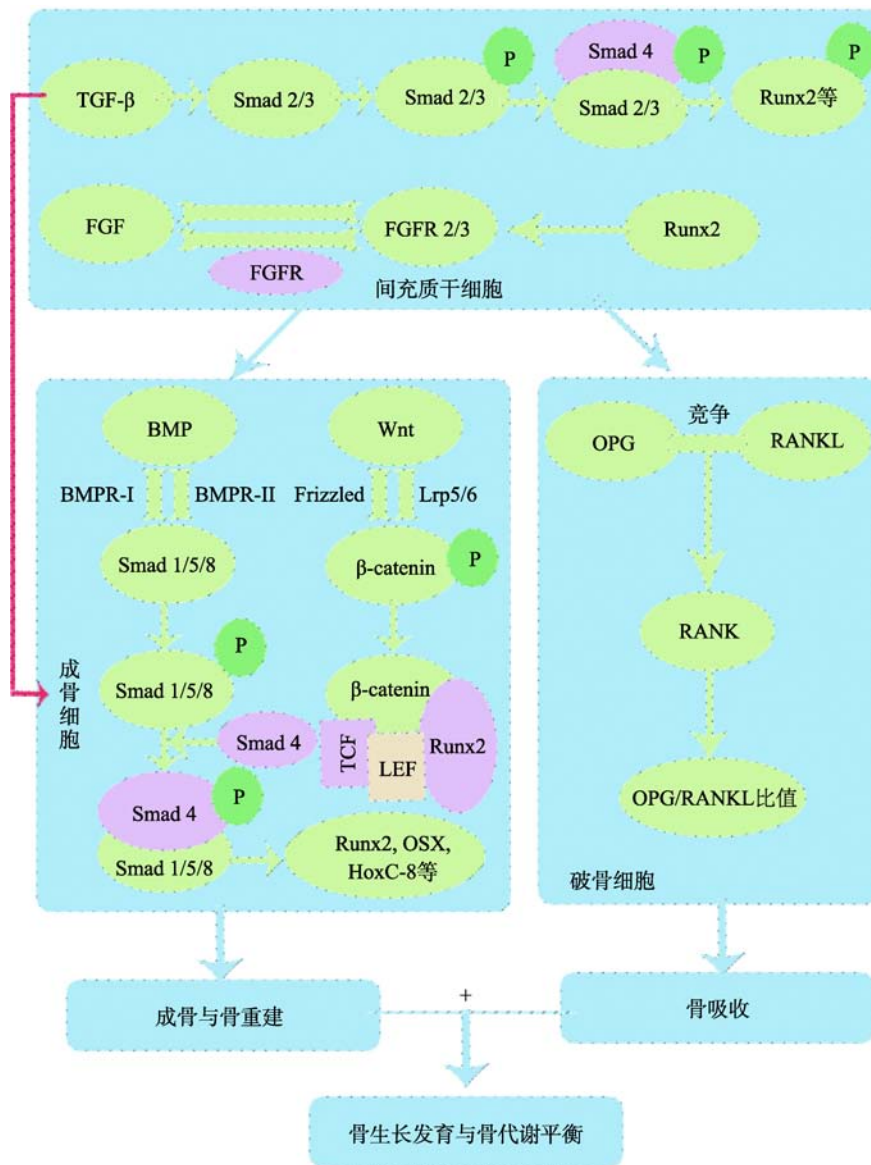


图 1 骨代谢调控的关键信号通路图

Fig. 1 Key signaling pathways for bone metabolism regulation

TGF- $\beta$  信号通路通过 Smad2/3 途径调节 BMSCs 的增殖、分化及其成骨细胞分化；FGF 信号通路中 FGF 和 FGFR 可调节 BMSCs 的增殖和成骨分化；BMP/Smads 信号通路通过激活 Smads1/5/8，结合 Smad4，再与 Runx2 和 OSX 等相互作用，调节成骨细胞分化与骨重建；Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路通过 Wnt 蛋白与 Frizzled 和 Lrp5/6 结合，激活  $\beta$ -catenin 并将其转移到细胞核与 TCF/LEF 等相互作用，激活 Wnt 靶基因的转录，从而调控成骨细胞的增殖、分化及骨形成；OPG/RANKL/RANK 信号通路中 OPG 和 RANKL 竞争性结合，阻止 RANKL 和 RANK 之间的结合，通过调节 OPG/RANKL 比值来调控骨吸收过程。该 5 条关键信号通路共同参与调节动物骨骼的生长发育与骨代谢平衡。

## 参考文献(References):

- [1] Lu L, Huang JS, Xu FY, Xiao ZS, Wang J, Zhang B, David NV, Arends D, Gu WK, Ackert-Bicknell C, Sabik OL, Farber CR, Quarles LD, Williams RW. Genetic dissection of femoral and tibial microarchitecture. *JBM Plus*, 2019, 3(12): e10241. [DOI]
- [2] Duren DL, Seselj M, Froehle AW, Nahhas RW, Sherwood RJ. Skeletal growth and the changing genetic landscape during childhood and adulthood. *Am J Phys Anthropol*, 2013, 150(1): 48–57. [DOI]
- [3] Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone*,



- 2015, 80: 14–18. [DOI]
- [4] Zhong ZD, Ethen NJ, Williams BO. WNT signaling in bone development and homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2014, 3(6): 489–500. [DOI]
- [5] Tang ZR, Wang Z, Qing FZ, Ni YL, Fan YJ, Tan YF, Zhang XD. Bone morphogenetic protein Smads signaling in mesenchymal stem cells affected by osteoinductive calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res A*, 2015, 103(3): 1001–1010. [DOI]
- [6] Ko CH, Chan RL, Siu WS, Shum WT, Leung PC, Zhang L, Cho CH. Deteriorating effect on bone metabolism and microstructure by passive cigarette smoking through dual actions on osteoblast and osteoclast. *Calcif Tissue Int*, 2015, 96(5): 389–400. [DOI]
- [7] Nguyen A, Scott MA, Dry SM, James AW. Roles of bone morphogenetic protein signaling in osteosarcoma. *Int Orthop*, 2014, 38(11): 2313–2322. [DOI]
- [8] Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res*, 2014, 93(4): 335–345. [DOI]
- [9] Dorman LJ, Tucci M, Benghuzzi H. *In vitro* effects of bmp-2, bmp-7, and bmp-13 on proliferation and differentiation of mouse mesenchymal stem cells. *Biomed Sci Instrum*, 2012, 48: 81–87. [DOI]
- [10] Mi M, Jin HT, Wang BL, Yukata K, Sheu TJ, Ke QH, Tong PJ, Im HJ, Xiao GZ, Chen D. Chondrocyte BMP2 signaling plays an essential role in bone fracture healing. *Gene*, 2013, 512(2): 211–218. [DOI]
- [11] Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*, 2011, 112(12): 3491–3501. [DOI]
- [12] Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*, 2010, 147(1): 35–51. [DOI]
- [13] Jang WG, Kim EJ, Lee KN, Son HJ, Koh JT. AMP-activated protein kinase (AMPK) positively regulates osteoblast differentiation via induction of *Dlx5*-dependent Runx2 expression in MC3T3E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 404(4): 1004–1009. [DOI]
- [14] Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 715–736. [DOI]
- [15] Liang WN, Lin MN, Li XH, Li CD, Gao BZ, Gan HJ, Yang ZY, Lin XJ, Liao LH, Yang M. Icariin promotes bone formation via the BMP-2/Smad4 signal transduction pathway in the hFOB 1.19 human osteoblastic cell line. *Int J Mol Med*, 2012, 30(4): 889–895. [DOI]
- [16] Choi YH, Kim YJ, Jeong HM, Jin YH, Yeo CY, Lee KY. Akt enhances Runx2 protein stability by regulating Smurf2 function during osteoblast differentiation. *FEBS J*, 2014, 281(16): 3656–3666. [DOI]
- [17] Takimoto A, Kawatsu M, Yoshimoto Y, Kawamoto T, Seiryu M, Takano-Yamamoto T, Hiraki Y, Shukunami C. Scleraxis and osterix antagonistically regulate tensile force-responsive remodeling of the periodontal ligament and alveolar bone. *Development*, 2015, 142(4): 787–796. [DOI]
- [18] Kruger C, Kappen C. Expression of cartilage developmental genes in *Hoxc8*- and *Hoxd4*-transgenic mice. *PLoS One*, 2010, 5(2): e8978. [DOI]
- [19] Li M, Liu XY, Liu XD, Ge BF. Calcium phosphate cement with bmp-2-loaded gelatin microspheres enhances bone healing in osteoporosis: A pilot study. *Clin Orthop Relat Res*, 2010, 468(7): 1978–1985. [DOI]
- [20] Dallari D, Savarino L, Greco M, Rani N, Del Piccolo N, Baldini N. Relevance of deep decortication and vascularization in a case of post-traumatic femoral non-union treated with grafts, platelet gel and bone marrow stromal cells. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2012, 20(9): 1834–1838. [DOI]
- [21] Yang WC, Guo DY, Harris MA, Cui Y, Gluhak-Heinrich J, Wu JJ, Chen XD, Skinner C, Nyman JS, Edwards JR, Mundy GR, Lichtler A, Kream BE, Rowe DW, Kalajzic I, David V, Quarles DL, Villareal D, Scott G, Ray M, Liu S, Martin JF, Mishina Y, Harris SE. *Bmp2* in osteoblasts of periosteum and trabecular bone links bone formation to vascularization and mesenchymal stem cells. *J Cell Sci*, 2013, 126(18): 4085–4098. [DOI]
- [22] Zappitelli T, Chen F, Aubin JE. Up-regulation of BMP2/4 signaling increases both osteoblast-specific marker expression and bone marrow adipogenesis in *Gja1Jrt/+* stromal cell cultures. *Mol Biol Cell*, 2015, 26(5): 832–842. [DOI]
- [23] Zarrinkalam MR, Schultz CG, Ardern DW, Vernon-Roberts B, Moore RJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-type 2 (rhBMP-2) enhances local bone formation in the lumbar spine of osteoporotic sheep. *J Orthop Res*, 2013, 31(9): 1390–1397. [DOI]
- [24] Cipitria A, Reichert JC, Epari DR, Saifzadeh S, Berner A, Schell H, Mehta M, Schuetz MA, Duda GN, Hutmacher DW. Polycaprolactone scaffold and reduced rhBMP-7 dose for the regeneration of critical-sized

- defects in sheep tibiae. *Biomaterials*, 2013, 34(38): 9960–9968. [DOI]
- [25] Mizrahi O, Sheyn D, Tawackoli W, Kallai I, Oh A, Su S, Da X, Zarrini P, Cook-Wiens G, Gazit D, Gazit Z. BMP-6 is more efficient in bone formation than BMP-2 when overexpressed in mesenchymal stem cells. *Gene Ther*, 2012, 20(4): 370–377. [DOI]
- [26] Chen GQ, Deng CX, Li YP. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(2): 272–288. [DOI]
- [27] Xing LP, Zhang M, Chen D. Smurf control in bone cells. *J Cell Biochem*, 2010, 110(3): 554–563. [DOI]
- [28] Takeshita S, Fumoto T, Matsuoka K, Park KA, Aburatani H, Kato S, Ito M, Ikeda K. Osteoclast-secreted CTHRC1 in the coupling of bone resorption to formation. *J Clin Invest*, 2013, 123 (9): 3914–3924. [DOI]
- [29] Chen JR, Lazarenko OP, Blackburn ML, Badeaux JV, Badger TM, Ronis MJ. Infant formula promotes bone growth in neonatal piglets by enhancing osteoblastogenesis through bone morphogenic protein signaling. *J Nutr*, 2009, 139(10): 1839–1847. [DOI]
- [30] Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Weber H, Bail HJ, Duda GN, Perka C, Schell H. Insight into the molecular pathophysiology of delayed bone healing in a sheep model. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(1): 191–199. [DOI]
- [31] Feng C, Xiao L, Yu JC, Li DY, Tang TY, Liao W, Wang ZR, Lu AQ. Simvastatin promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in rat model of osteoporosis through BMP-2/Smads signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(1): 434–443. [DOI]
- [32] Chai S, Wan L, Wang JL, Huang JC, Huang HX. Gushukang inhibits osteocyte apoptosis and enhances BMP-2/Smads signaling pathway in ovariectomized rats. *Phytomedicine*, 2019, 64: 153063. [DOI]
- [33] Yu B, Tang DZ, Li SY, Wu Y, Chen M. Daidzein promotes proliferation and differentiation in osteoblastic OCT1 cells via activation of the BMP-2/Smads pathway. *Pharmazie*, 2017, 72(1): 35–40. [DOI]
- [34] Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in TGF- $\beta$  signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21: 659–693. [DOI]
- [35] Chaudhry SS, Cain SA, Morgan A, Dallas SL, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGF $\beta$ 1. *J Cell Biol*, 2007, 176(3): 355–367. [DOI]
- [36] Dünker N, Kriegelstein K. TGF- $\beta$ 1 $^{-/-}$  Tgf $\beta$ 3 $^{-/-}$  double knockout mice display severe midline fusion defects and early embryonic lethality. *Anat Embryol (Berl)*, 2002, 206(1–2): 73–83. [DOI]
- [37] Yasui T, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Matsumoto T, Masuda H, Hirose J, Omata Y, Yasuda H, Imamura T, Nakamura K, Tanaka S. Regulation of RANKL-induced osteoclastogenesis by TGF- $\beta$  through molecular interaction between Smad3 and Traf6. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(7): 1447–1456. [DOI]
- [38] Mohammad KS, Chen CG, Balooch G, Stebbins E, McKenna CR, Davis H, Niewolna M, Peng XH, Nguyen DH, Ionova-Martin SS, Bracey JW, Hogue WR, Wong DH, Ritchie RO, Suva LJ, Derynck R, Guise TA, Alliston T. Pharmacologic inhibition of the TGF- $\beta$  type I receptor kinase has anabolic and anti-catabolic effects on bone. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5275. [DOI]
- [39] Karst M, Gorny G, Galvin RJ, Oursler MJ. Roles of stromal cell RANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF- $\beta$  regulation of osteoclast differentiation. *J Cell Physiol*, 2004, 200(1): 99–106. [DOI]
- [40] Subramaniam M, Hawse JR, Bruinsma ES, Grygo SB, Cicek M, Oursler MJ, Spelsberg TC. TGF $\beta$  inducible early gene-1 directly binds to, and represses, the OPG promoter in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010(1), 392(1): 72–76. [DOI]
- [41] Shi AY, Heinayati A, Bao DY, Liu HF, Ding XC, Tong X, Wang LD, Wang B, Qin HY. Small molecule inhibitor of TGF- $\beta$  signaling enables robust osteogenesis of autologous GMSCs to successfully repair minipig severe maxillofacial bone defects. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 172. [DOI]
- [42] Zeng HC, Bae Y, Dawson BC, Chen YQ, Bertin T, Munivez E, Campeau PM, Tao JN, Chen R, Lee BH. MicroRNA miR-23a cluster promotes osteocyte differentiation by regulating TGF- $\beta$  signalling in osteoblasts. *Nat Commun*, 2017, 8: 15000. [DOI]
- [43] Xu X, Zheng LW, Bian Q, Xie L, Liu WL, Zhen GH, Crane JL, Zhou XD, Cao X. Aberrant activation of TGF- $\beta$  in subchondral bone at the onset of rheumatoid arthritis joint destruction. *J Bone Miner Res*, 2015, 30(11): 2033–2043. [DOI]
- [44] Tu XL, Delgado-Calle J, Condon KW, Maycas M, Zhang H, Carlesso N, Taketo MM, Burr DB, Plotkin LI, Bellido T. Osteocytes mediate the anabolic actions of canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in bone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(5): E478–486. [DOI]
- [45] Boyden LM, Mao JH, Belsky J, Mitzner L, Farhi A,

- Mitnick MA, Wu DQ, Insogna K, Lifton RP. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med*, 2002, 346(20): 1513–1521. [DOI]
- [46] Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu XT, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Nogues X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Van Eerdewegh P, Recker RR, Johnson ML. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(1): 11–19. [DOI]
- [47] Hu HL, Hilton MJ, Tu XL, Yu K, Ornitz DM, Long FX. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development*, 2005, 132(1): 49–60. [DOI]
- [48] Day TF, Guo XZ, Garrett-Beal L, Yang YZ. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*, 2005, 8(5): 739–750. [DOI]
- [49] Hill TP, Später D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell*, 2005, 8(5): 727–738. [DOI]
- [50] Rodda SJ, McMahon AP. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development*, 2006, 133(16): 3231–3244. [DOI]
- [51] Glass DA, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long FX, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell*, 2005, 8(5): 751–764. [DOI]
- [52] Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, Sigler RE, Faugere MC, Bouxsein ML, Deng LF, Clemens TL, Williams BO. Essential role of  $\beta$ -catenin in postnatal bone acquisition. *J Biol Chem*, 2005, 280(22): 21162–21168. [DOI]
- [53] Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, Feng JQ, Bonewald LF, Kneissel M. Osteocyte Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(12): 3071–3085. [DOI]
- [54] Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA, Manolagas SC, Jilka RL. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: A novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology*, 2005, 146(11): 4577–4583. [DOI]
- [55] O'Brien CA, Plotkin LI, Galli C, Goellner JJ, Gortazar AR, Allen MR, Robling AG, Bouxsein M, Schipani E, Turner CH, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, Bellido T. Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes. *PLoS One*, 2008, 3(8): e2942. [DOI]
- [56] Tu XL, Rhee Y, Condon KW, Bivi N, Allen MR, Dwyer D, Stolina M, Turner CH, Robling AG, Plotkin LI, Bellido T. Sost downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. *Bone*, 2012, 50(1): 209–217. [DOI]
- [57] Loots GG, Kneissel M, Keller H, Baptist M, Chang J, Collette NM, Ovcharenko D, Plajzer-Frick I, Rubin EM. Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res*, 2005, 15(7): 928–935. [DOI]
- [58] Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, Lacza C, Wuyts W, Van Den Ende J, Willems P, Paes-Alves AF, Hill S, Bueno M, Ramos FJ, Tacconi P, Dikkers FG, Stratakis C, Lindpaintner K, Vickery B, Foerzler D, Van Hul W. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet*, 2001, 10(5): 537–543. [DOI]
- [59] Wang YY, Zhang XH, Shao J, Liu HH, Liu X, Luo E. Adiponectin regulates BMSC osteogenic differentiation and osteogenesis through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3652. [DOI]
- [60] Zhu Y, Wang YM, Jia YC, Xu J, Chai YM. Catalpol promotes the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 37. [DOI]
- [61] Molagoda IMN, Karunarathne WAHM, Choi YH, Park EK, Jeon YJ, Lee BJ, Kang CH, Kim GY. Fermented oyster extract promotes osteoblast differentiation by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, leading to bone formation. *Biomolecules*, 2019, 9(11): 711. [DOI]
- [62] Chen X, Wang ZQ, Duan N, Zhu GY, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res*, 2018, 59(2): 99–107. [DOI]



- [63] Hamdy NAT. Targeting the RANK/RANKL/OPG signaling pathway: a novel approach in the management of osteoporosis. *Curr Opin Investig Drugs*, 2007, 8(4): 299–303. [DOI]
- [64] Hofbauer LC, Kühne CA, Viereck V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2004, 4(3): 268–275. [DOI]
- [65] Sisay M, Abdela J, Molla Y. The molecular triad system involving RANK/RANKL/OPG as therapeutic targets for metabolic bone diseases. *JDDT*, 2016, 6(6): 31–39. [DOI]
- [66] Ono T, Hayashi M, Sasaki F, Nakashima T. RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond. *Inflamm Regen*, 2020, 40: 2. [DOI]
- [67] Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*, 2006, 12(1): 17–25. [DOI]
- [68] Kawaida R, Ohtsuka T, Okutsu J, Takahashi T, Kadono Y, Oda H, Hikita A, Nakamura K, Tanaka S, Furukawa H. Jun dimerization protein 2 (JDP2), a member of the AP-1 family of transcription factor, mediates osteoclast differentiation induced by RANKL. *J Exp Med*, 2003, 197(8): 1029–1035. [DOI]
- [69] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89(2): 309–319. [DOI]
- [70] Melville KM, Kelly NH, Khan SA, Schimenti JC, Ross FP, Main RP, van der Meulen MCH. Female mice lacking estrogen receptor- $\alpha$  in osteoblasts have compromised bone mass and strength. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(2): 370–379. [DOI]
- [71] Liu Y, Du HM, Wang YF, Liu MM, Deng SJ, Fan LL, Zhang LL, Sun Y, Zhang Q. Osteoprotegerin-knockout mice developed early onset root resorption. *J Endod*, 2016, 42(10): 1516–1522. [DOI]
- [72] Kostenuik PJ. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. *Curr Opin Pharmacol*, 2005, 5(6): 618–625. [DOI]
- [73] Titanji K, Vunnavu A, Sheth AN, Delille C, Lennox JL, Sanford SE, Foster A, Knezevic A, Easley KA, Weitzmann MN, Ofotokun I. Dysregulated B cell expression of RANKL and OPG correlates with loss of bone mineral density in HIV infection. *PLoS Pathog*, 2014, 10(10): e1004497. [DOI]
- [74] Huang SC, Zhang LH, Zhang JL, Rehman MU, Tong XL, Qiu G, Jiang X, Iqbal M, Shahzad M, Shen YQ, Li JK. Role and regulation of growth plate vascularization during coupling with osteogenesis in tibial dyschondroplasia of chickens. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 3680. [DOI]
- [75] Wu RX, Li Q, Pei XH, Hu KF. Effects of brucine on the OPG/RANKL/RANK signaling pathway in MDA-MB-231 and MC3T3-E1 cell coculture system. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 1693643. [DOI]
- [76] Hou JM, Xue Y, Lin QM. Bovine lactoferrin improves bone mass and microstructure in ovariectomized rats via OPG/RANKL/RANK pathway. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(10): 1277–1284. [DOI]
- [77] Ma B, Zhang Q, Wu D, Wang YL, Hu YY, Cheng YP, Yang ZD, Zheng YY, Ying HJ. Strontium fructose 1,6-diphosphate prevents bone loss in a rat model of postmenopausal osteoporosis via the OPG/RANKL/RANK pathway. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(4): 479–489. [DOI]
- [78] Yun YR, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, Jang JH, Shin US, Kim HW. Fibroblast growth factors: Biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng*, 2010, 2010: 218142. [DOI]
- [79] Ornitz DM, Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev*, 2002, 16(12): 1446–1465. [DOI]
- [80] Coutu DL, Galipeau J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3(10): 920–933. [DOI]
- [81] Du XL, Xie YL, Xian CJ, Chen L. Role of FGFs/FGFRs in skeletal development and bone regeneration. *J Cell Physiol*, 2012, 227(12): 3731–3743. [DOI]
- [82] Xiao GZ, Jiang D, Gopalakrishnan R, Franceschi RT. Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. *J Biol Chem*, 2002, 277(39): 36181–36187. [DOI]
- [83] Jacob AL, Smith C, Partanen J, Ornitz DM. Fibroblast growth factor receptor 1 signaling in the osteochondrogenic cell lineage regulates sequential steps of osteoblast maturation. *Dev Biol*, 2006, 296(2): 315–328. [DOI]

- [84] Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, Baldini N, Cenni E, Gomez-Barrena E, Granchi D, Kassem M, Konttinen YT, Mustafa K, Pioletti DP, Sillat T, Finne-Wistrand A. Bone regeneration and stem cells. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(4): 718–746. [DOI]
- [85] Huang W, Yang SY, Shao JZ, Li YP. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci*, 2007, 12: 3068–3092. [DOI]
- [86] Kanda Y, Nishimura I, Sato T, Katayama A, Arano T, Ikada Y, Yoshinari M. Dynamic cultivation with radial flow bioreactor enhances proliferation or differentiation of rat bone marrow cells by fibroblast growth factor or osteogenic differentiation factor. *Regen Ther*, 2016, 5: 17–24. [DOI]
- [87] Furuya H, Tabata Y, Kaneko K. Bone regeneration for murine femur fracture by gelatin hydrogels incorporating basic fibroblast growth factor with different release profiles. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(9–10): 1531–1541. [DOI]
- [88] D’Mello S, Elangovan S, Salem AK. FGF2 gene activated matrices promote proliferation of bone marrow stromal cells. *Arch Oral Biol*, 2015, 60(12): 1742–1749. [DOI]
- [89] Khorsand B, Nicholson N, Do AV, Femino JE, Martin JA, Petersen E, Guetschow B, Fredericks DC, Salem AK. Regeneration of bone using nanoplex delivery of FGF-2 and BMP-2 genes in diaphyseal long bone radial defects in a diabetic rabbit model. *J Control Release*, 2017, 248: 53–59. [DOI]
- [90] Charles LF, Woodman JL, Ueno D, Gronowicz G, Hurley MM, Kuhn LT. Effects of low dose FGF-2 and BMP-2 on healing of calvarial defects in old mice. *Exp Gerontol*, 2015, 64: 62–69. [DOI]
- [91] Yuan SH, Pan Q, Fu CJ, Bi ZG. Effect of growth factors (BMP-4/7 & bFGF) on proliferation & osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Indian J Med Res*. 2013, 138(1): 104–110. [DOI]
- [92] Majidinia M, Alizadeh E, Yousefi B, Akbarzadeh M, Mihanfar A, Rahmati-Yamchi M, Zarghami N. Co-inhibition of notch and NF- $\kappa$ B signaling pathway decreases proliferation through downregulating IkB- $\alpha$  and hes-1 expression in human ovarian cancer OVCAR-3 cells. *Drug Res (Stuttg)*, 2017, 67(1): 13–19. [DOI]
- [93] Hilton MJ, Tu XL, Wu XM, Bai ST, Zhao HB, Kobayashi T, Kronenberg HM, Teitelbaum SL, Ross FP, Kopan R, Long FX. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nat Med*, 2008, 14(3): 306–314. [DOI]
- [94] Tu XL, Chen JQ, Lim J, Karner CM, Lee SY, Heisig J, Wiese C, Surendran K, Kopan R, Gessler M, Long FX. Physiological notch signaling maintains bone homeostasis via RBPjk and Hey upstream of NFATc1. *PLoS Genet*, 2012, 8(3): e1002577. [DOI]
- [95] Pan MX, Hong W, Yao Y, Gao XX, Zhou Y, Fu GX, Li YC, Guo Q, Rao XX, Tang PY, Chen SZ, Jin WF, Hua GQ, Gao JJ, Xu XY. Activated B lymphocyte inhibited the osteoblastogenesis of bone mesenchymal stem cells by Notch signaling. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 8150123. [DOI]
- [96] He Y, Zou LJ. Notch-1 inhibition reduces proliferation and promotes osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Exp Ther Med*, 2019, 18(3): 1884–1890. [DOI]
- [97] Fukushima H, Nakao A, Okamoto F, Shin M, Kajiya H, Sakano S, Bigas A, Jimi E, Okabe K. The association of notch2 and nf-kappab accelerates rankl-induced osteoclastogenesis. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(20): 6402–6412. [DOI]
- [98] Capurro M, Izumikawa T, Suarez P, Shi W, Cydzik M, Kaneiwa T, Garipey J, Bonafe L, Filmus J. Glypican-6 promotes the growth of developing long bones by stimulating Hedgehog signaling. *J Cell Biol*, 2017, 216(9): 2911–2926. [DOI]
- [99] St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev*, 1999, 13(16): 2072–2086. [DOI]
- [100] Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*, 1996, 273(5275): 613–622. [DOI]
- [101] Luo M, Huang HX, Huang H, Li ZT, Lai YY. Hedgehog signaling pathway and osteoporosis. *Zhongguo Gu Shang*, 2014, 27(2): 169–172. [DOI]
- [102] Zaman F, Zhao YH, Calvin B, Mehta HH, Wan JX, Chrysis D, Ohlsson C, Fadeel B, Cohen P, Sälvendahl L. Humanin is a novel regulator of Hedgehog signaling and prevents glucocorticoid-induced bone growth impairment. *FASEB J*, 2019, 33(4): 4962–4974. [DOI]
- [103] Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F, Hirsch E. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: An

- updated review. *Ann Med*, 2014, 46(6): 372–383. [DOI]
- [104] Liu TJ, Gao YH, Sakamoto K, Minamizato T, Furukawa K, Tsukazaki T, Shibata Y, Bessho K, Komori T, Yamaguchi A. BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in Runx2-deficient cell lines. *J Cell Physiol*, 2007, 211(3): 728–735. [DOI]
- [105] Ke K, Li Q, Yang XF, Xie ZJ, Wang Y, Shi J, Chi LF, Xu WJ, Hu LL, Shi HL. Asperosaponin VI promotes bone marrow stromal cell osteogenic differentiation through the PI3K/AKT signaling pathway in an osteoporosis model. *Sci Rep*, 2016, 6: 35233. [DOI]
- [106] Barradas AM, Fernandes HA, Groen N, Chai YC, Schrooten J, van de Peppel J, van Leeuwen JP, van Blitterswijk CA, de Boer J. A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Biomaterials*, 2012, 33(11): 3205–3215. [DOI]
- [107] Liedert A, Kaspar D, Blakytyn R, Claes L, Ignatius A. Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 349(1): 1–5. [DOI]
- [108] Liu JN, Lv FQ, Sun W, Tao CX, Ding GX, Karaplis A, Brown E, Goltzman D, Miao DS. The abnormal phenotypes of cartilage and bone in calcium-sensing receptor deficient mice are dependent on the actions of calcium, phosphorus, and PTH. *PLoS Genet*, 2011, 7(9): e1002294. [DOI]
- [109] Chang WH, Tu CL, Chen TH, Bikle D, Shoback D. The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) is a critical modulator of skeletal development. *Sci Signal*, 2008, 1(35): ra1. [DOI]
- [110] Wang B, Lin J, Zhang Q, Zhang XY, Yu H, Gong P, Xiang L.  $\alpha$ CGRP Affects BMSCs' Migration and Osteogenesis via the Hippo-YAP Pathway. *Cell Transplant*, 2019, 28(11): 1420–1431. [DOI]
- [111] Chen Z, Luo Q, Lin CC, Kuang DD, Song GB. Simulated microgravity inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via depolymerizing F-actin to impede TAZ nuclear translocation. *Sci Rep*, 2016, 6: 30322. [DOI]

(责任编辑: 张雷)