

综述

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2023.10.003

中医药介导 AMPK/mTOR 信号通路治疗骨质疏松症的研究进展

张文豪 易林 向文远 热米拉·艾买提 邓迎杰 廖军 梁志权 李雷疆 方锐

【摘要】 骨质疏松症 (OP) 是一种全身性骨骼疾病, 是老年人群常见的骨科疾患, 较高的发病率、致残致死率、治疗费用等问题给患者家庭带来了较大的影响, 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AMPK) / 雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路对细胞的代谢和凋亡有重要意义。中药单体或中药复方能够通过 AMPK/mTOR 信号通路影响相关因子表达防治 OP, 但具体机制尚未完全阐明。该文就 AMPK/mTOR 通路对成骨细胞和破骨细胞的作用以及中医药在其中的调节作用问题进行综述, 为下一步的 OP 防治工作提供新的视角和思路。

【关键词】 骨质疏松症; AMPK/mTOR 信号通路; 中医药; 成骨细胞; 破骨细胞

Advances in Chinese medicine-mediated AMPK/mTOR signaling pathway for the treatment of osteoporosis Zhang Wenhao, Yi Lin, Xiang Wenyuan, Remira · Aimaiti, Deng Yingjie, Liao Jun, Liang Zhiquan, Li Leijiang, Fang Rui. Department of Orthopedics II, Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University (Institute of Traditional Chinese Medicine of Xinjiang Uygur Autonomous Region), Urumqi 830099, China
Corresponding author, Fang Rui, E-mail: xjfrdoctor@163.com

【Abstract】 Osteoporosis (OP) is a systemic bone disease and a common orthopedic disorder in elderly patients. High morbidity, disability and mortality rates and medical cost of OP bring huge burden to the patients and their family. Serine/threonine protein kinase (AMPK) / mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway plays a significant role in cell metabolism and apoptosis. Traditional Chinese medicine monomer or compound can prevent and treat OP by regulating the expression levels of related factors through the AMPK/mTOR signaling pathway, whereas the specific mechanism remains elusive. In this article, the effect of AMPK/mTOR signaling pathway upon osteoblasts and osteoclasts, and the regulatory role of traditional Chinese medicine were reviewed, aiming to provide novel perspectives and ideas for prevention and treatment of OP.

【Key words】 Osteoporosis; AMPK/mTOR signaling pathway; Chinese medicine; Osteoblast; Osteoclast

骨质疏松症 (OP) 是一种因骨量低下、骨组织微结构损坏导致的以脆性增加、易发生骨折为特征的全身性骨病^[1]。绝经后骨质疏松症 (PMOP) 是最常见的 OP 类型。50 岁以上女性 OP 患病率高达 32% 以上^[2]。预计 2035 年我国发生的骨质疏松性骨折 (腕部、椎体和髌部) 将达 483 万例次, 到 2050 年将达 599 万例次^[3]。OP 造成的骨折和 OP 性疼痛是 OP 患者最突出的临床表现, 也是 OP 患者生活质量和药物治疗效果下降的主要原因。此外 OP 引发的并发症可导致患者焦虑、睡眠质量降低, 甚至出现自闭等严重精神障碍。虽然现代医学对于 OP 患者的部分症状具有缓解作

用, 但也带来一定不良反应, 比如胃肠道反应、疼痛缓解性差、价格昂贵等问题^[4]。目前, 选择不良反应小、标本兼治、可长期服用、价格合理的中草药防治 OP 方案已得到部分专家推荐^[1]。

自噬是通过溶酶体降解消除细胞内功能障碍成分和细胞外生物的一种细胞自我保护的分解代谢机制, 与成骨和骨骼发育有关, 越来越多的证据表明, 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AMPK) 和哺乳动物自噬参与骨形成、再吸收, 与 OP 防治密切相关^[4]。本文对 AMPK/雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路在 OP 发病中的具体分子靶向机制, 以及中医药对于该分子靶向机制的调节用于治疗 OP 的

现况做一综述。

一、AMPK/mTOR 信号通路在 OP 产生中的作用

PMOP 与雌激素缺乏、细胞自噬失衡、细胞凋亡增加、活性氧增加等因素有关^[4]。根据证型,中医主要将 OP 分为肝肾阴虚、脾肾阳虚、肾虚血瘀、肾阴阳两虚。OP 的发生与自噬失衡有关,自噬及自噬相关蛋白在骨代谢稳态中起着非常重要的作用。自噬是 OP 研究的重要方向,其中 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬在骨代谢稳态的调控中发挥着重要作用,是各种因素的主要汇聚点之一。AMPK 与 mTOR 的活性调节密切相关,Bai 等(2017 年)的研究显示活化的 AMPK 可磷酸化激活蛋白复合物 TSC1/2 蛋白,进而抑制 mTOR 活性,陈知斌等(2021 年)发现大鼠 AMPK mRNA 的表达与蛋白磷酸化水平上调有关,mTOR RNA 的表达与蛋白磷酸化水平下调有关;左归丸可以下调 AMPK mRNA 的表达和蛋白磷酸化水平,右归丸可以上调 mTOR mRNA 的表达和蛋白磷酸化水平。

1. AMPK/mTOR 信号通路在成骨细胞中的作用

AMPK/mTOR 信号通路是自噬的经典信号通路,其中 AMPK 已被公认是通过各种信号通路调节细胞增殖、分化、凋亡、自噬和线粒体功能的关键能量传感器和代谢调节剂,它不仅能间接调节成骨细胞和破骨细胞的功能,而且直接参与成骨细胞矿化和破骨细胞褶皱的形成^[5]。AMPK 可通过抑制 mTOR 促进自噬的启动,AMPK 可通过 UNC-51 样激酶 1 (AMPK-ULK1) - 自噬轴促进成骨分化,通过直接磷酸化诱导自噬,直接磷酸化磷脂酰肌醇 3- 激酶 (PI3K) 催化亚基 3 型复合物和 BECN1 (Ⅲ类 PtdIns3K 复合物的核心成分) 来诱导自噬反应的发生^[6]。AMPK 是 AMP 依赖的蛋白激酶,是生物能量代谢调节的关键分子,体内 AMP/ATP 比例的升高能激活 AMPK,骨基质的形成、矿化以及骨吸收需要的大量 ATP,因此 AMPK 的激活可以有效促进骨形成。

Wei 等^[7]发现成骨细胞中的葡萄糖摄取是成骨细胞分化和骨形成的早期决定性因素,成骨细胞对葡萄糖的摄取通过 2 种不同的方式,一是通过抑制 AMPK 的活性,葡萄糖摄取增强 mTORC1 通路的活性,从而增强蛋白质的合成;二是抑制 AMPK 通过 SMAD 特异性的 e3 泛素蛋白连接酶 1 (SMURF1) 促进 Runt 相关转录因子 2 (RUNX2,

成骨细胞分化的主要决定因素) 泛素化的作用,AMPK 的过度激活并不利于成骨,这从某些层面证实了 AMPK 与成骨细胞的分化关系密切。Qu 等(2016 年)发现 AMPK 信号通路可促进成骨细胞分化和血管生成,进而促进骨愈合。

Li 等^[8]发现 AMPK 激活可刺激小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 (MC3T3-E1) 的成骨分化,使成骨细胞矿化以及碱性磷酸酶 (ALP)、骨钙素和 RUNX2 的 mRNA 表达上调,同时 AMPK 通过上调微管相关蛋白 1A/1B 轻链 3B 增加自噬体密度。mTOR 存在于 2 种不同的蛋白复合物中,即 mTORC1 和 mTORC2,用雷帕霉素抑制 mTORC1 会激活 mTORC2,增强自噬并募集抗凋亡信号,从而防止钙化,故 mTORC2 具有促间充质干细胞 (MSC) 成骨细胞分化的作用,mTORC1 与各种衰老过程相关,如细胞营养、蛋白质稳态维持、自噬、线粒体功能障碍和细胞衰老。Lu 等^[9]发现敲除长链非编码 RNA TUG1 (taurine upregulated 1) 可延缓骨髓 MSC (BMSC) 的成骨诱导,RUNX2、骨唾液酸蛋白基因 (BSP)、骨钙素 (OCN) 和 I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链 (COL1A1) 等成骨相关标志物表达下调,BMSC 的 AMPK 和 P53 表达下调,而 TUG1 的过表达则上调 AMPK 和 P53 的表达,并下调 BMSC 中 mTOR 的表达,因此认为 TUG1 通过 AMPK/mTOR/自噬轴促进 BMSC 成骨分化。

2. AMPK/mTOR 信号通路在破骨细胞中的作用

破骨细胞属于多核巨细胞,参与骨吸收过程。破骨细胞的分化和功能实施需要一系列的细胞因子去除旧骨,这与成骨细胞介导的骨形成诱导骨重塑相协调,而 AMPK 在破骨细胞分化和功能中可起负向调节作用。高水平葡萄糖通过降低 AMPK 磷酸化和自噬水平抑制 RAW264.7 细胞来源的破骨细胞的分化和功能^[10]。AMPK α 亚基包含 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 亚型,敲除 $\alpha 1$ 或 $\alpha 2$ 亚基的 AMPK 小鼠通过增强体内破骨细胞的分化和功能表现出骨量减少的状态。葡萄糖缺乏或低氧诱导因子 1 α 已被证明可抑制破骨细胞的骨吸收,AMPK 磷酸化可抑制破骨细胞分化,在葡萄糖饥饿条件下,激活的 AMPK 通过使 mTORC1 失活促进 Ser757 位点的 UNC-51 样激酶 1 (ULK1) 磷酸化,随后在 Ser317 和 Ser777 位点磷酸化的 ULK1 通过 AMPK-ULK 复合物启动自噬^[11]。Tong 等^[10]发现骨保护素 (OPG) 能激活 AMPK。在 OPG 介导的破骨细胞分化抑制过程中,激活的 AMPK 通过抑制 mTOR 和下游靶标 p70S6K

的磷酸化达到抑制破骨细胞分化效果。活性 AMPK 会导致 TSC1/2 复合物磷酸化和激活, 从而通过 Ras 超家族的小 GTP 酶 (Rheb) 抑制 mTOR 活性^[2]。由于破骨细胞在骨髓的前单核细胞前体分化和骨吸收的过程中均需要高水平的葡萄糖, 而 AMPK 与葡萄糖等关系密切, 故 AMPK 与破骨细胞的分化和骨吸收存在一定关联, AMPK/mTOR/ULK1 信号通路被认为是葡萄糖饥饿激活的中枢代谢调节因子, 它可以通过激活自噬促进补偿性能量产生过程, 参与葡萄糖诱导的破骨细胞生成和调节自噬。

二、中医药介导 AMPK/mTOR 信号通路防治 OP

1. 中药单体

淫羊藿苷 (ICT) 是从淫羊藿中分离出来的主要生物活性成分, 淫羊藿属小檗科多年生植物, 是一种重要的预防骨代谢紊乱的药用植物, 最早记载于《神农本草经》, 化学成分包括黄酮类、多糖类、木脂素与生物碱等。淫羊藿具有多种药理活性, 包括刺激神经元分化、抑制破骨细胞分化、促进心肌细胞分化、抑制细胞增殖等^[13]。Zhao 等 (2020 年) 发现经 ICT 处理肺癌诱导的破骨细胞后, 其 AMPK mRNA 表达上调, 而 mTOR mRNA 表达则下调, ICT 显著降低了破骨细胞分化标志物如组织蛋白酶 K 的表达, 可提高细胞诱导的 RAW264.7 细胞中 AMPK 的磷酸化水平并抑制 mTOR 的磷酸化, 因此认为 ICT 通过抑制 AMPK/mTOR 信号通路抑制破骨细胞生成。

人参皂苷 (C42H72O13) 是人参中最有价值的活性成分, 目前科学家已提取和鉴定了 100 多种人参皂苷单体。在这些单体中, 人参皂苷 Rg3 被认为是最有效的甾体皂苷, 它在各种模型中均表现出抗氧化、抗炎、抗癌和神经保护活性, 且在体外具有骨保护作用, 可抑制 RAW264.7 细胞中的破骨细胞分化^[14]。Zhang 等^[15]发现人参皂苷 Rg3 能改善双侧卵巢切除术诱导的 OP 大鼠模型中的骨丢失和骨小梁结构的改变, 并认为其可以增强自噬、激活 AMPK 信号、抑制 mTOR 信号, 从而降低 OP 的发病率。

槲皮素是从芦丁 (芸香苷)、槲皮苷、金丝桃苷中提取的主要生物活性黄酮类化合物, Guo 等 (2017 年) 发现槲皮素使成骨细胞标志物如 OCN、骨桥蛋白、OPG 和骨形态发生蛋白 -2 (BMP-2) 的

表达上调。Sun 等^[16]通过实验发现, 槲皮素可改善骨密度及骨小梁骨的微观结构, 以及改善骨质硬度、平衡运动能力、腓肠肌的形态学等避免骨折的因素, 同时提高骨钙蛋白、RUNX2 和 Osterix 蛋白水平, 以及促进 AMPK 磷酸化并抑制 mTOR 磷酸化通路, 降低 OP 的发病率。

白藜芦醇是一种结构类似雌激素己烯雌酚的天然多酚类化合物, 广泛存在于葡萄、花生、虎杖等植物中, 游丽娟等 (2021 年) 发现白藜芦醇可改善骨质疏松大鼠的骨质量, 降低血清碱性磷酸酶和骨钙素水平, 使成骨细胞中沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (SIRT1)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 和 Beclin-1 的表达上调, 降低 AKT 和 mTOR 的磷酸化水平, 以及通过增强线粒体自噬来保护骨质疏松大鼠的成骨细胞。

2. 中药复方

壮骨止痛胶囊由补骨脂、淫羊藿、川牛膝、枸杞子、狗脊、女贞子、骨碎补等组成, 具有补益肝肾、壮骨止痛之效, 陈沙等 (2022 年) 发现壮骨止痛胶囊可促进 BMSC 的增长及升高 ALP 活性, 并通过脂向分化的自噬抑制作用促进成骨。Men 等^[17]建立了 PMOP 小鼠模型, 发现壮骨止痛胶囊可提高其疼痛阈值、腰椎骨小梁密度、B-ALP、I 型前胶原氨基端前肽 (PINP) 和 I 型前胶原 C 端交联肽 (CTX) 的血清水平, 抑制 TNF- α 、IL-17 和 IL-1 β 的释放, 通过激活 AMPK、抑制 mTOR 来提高自噬相关因子 Atg-5、Beclin-1、LC3 II、ULK1 的表达, 最终起到抗骨质疏松作用。AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬在镇痛中起主要作用, Liu 等 (2022 年) 发现壮骨止痛胶囊可调节 AMPK/mTOR 信号通路, 从而缓解患者的 OP 疼痛以及提高骨密度。

左、右归丸出自《景岳全书·新方八阵》, 《中华人民共和国药典》指出该药具有补肾填精、益髓壮骨的作用^[18]。在 OP 小鼠模型中, 左归丸可使 AMPK 基因表达和 p-AMPK α 蛋白表达下调, 而右归丸则起相反作用, 表明两者的作用机制存在差异, 中医辨证分型认为左归丸主要应用于肝肾阴虚证, 而右归丸主要应用于脾肾阳虚证, 从中医角度可认为 2 种证型的差异可能与 p-AMPK α 蛋白的水平高低有关^[19-20]。左、右归丸可通过干预 AMPK/mTOR 信号通路来调节骨代谢, 抑制破骨细胞分化。从 AMPK/mTOR 蛋白磷酸化水平也可验证中医对于 OP 的辨证分型的重要性, 关于肾虚血

瘀证、肾阴阳两虚与 AMPK/mTOR 的关系, 仍需进一步研究。

总之, AMPK/mTOR 信号通路可调节 ULK1、OCN、RUNX2、ERK1/2 等来影响 OP, 但是 OP 的发生是多因素的, 在成骨细胞和破骨细胞的调节中, 中药具有多成分、多靶点、多途径的独特优势, 有助于达到骨重建平衡。然而, 现阶段中医药防治 OP 的相关研究仍存在一些不足: ①我国幅员辽阔, 中医治疗一般因地制宜, 缺少相应的辨证分析; ②大多数 OP 模型的建立基于小鼠构建, 而中医复方和单体中药的中医传统经方多以人为基础, 故可能存在差异, 在后期的工作中, 可通过人干细胞建立相应模型, 从发病机制到药效学角度为 OP 的治疗提供新的思路及理论支撑; ③对中药有效组分应进行深入挖掘, 阐述中药有效组分在治疗 OP 的内在机制及相关通路, 弘扬我国中医及中药文化。

参 考 文 献

- [1] 史晓林, 刘康. 骨质疏松性骨折中医诊疗指南. 中国骨质疏松杂志: 1-16.
- [2] Xie Y M, Liu H, Jiang J J, et al. Clinical practice guideline for postmenopausal osteoporosis with traditional Chinese medicine. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2021, 46 (22): 5992-5998.
- [3] Si L, Winzenberg T M, Jiang Q, et al. Projection of osteoporosis-related fractures and costs in China: 2010-2050. *Osteoporos Int*, 2015, 26 (7): 1929-1937.
- [4] Zhang X, Huang F, Chen X, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates ovariectomy-induced osteoporosis via AMPK/mTOR signaling pathway. *Drug Dev Res*, 2020, 81 (7): 875-884.
- [5] Kong C, Wang C, Shi Y, et al. Active vitamin D activates chondrocyte autophagy to reduce osteoarthritis via mediating the AMPK-mTOR signaling pathway. *Biochem Cell Biol*, 2020, 98 (3): 434-442.
- [6] Kim J, Kim Y C, Fang C, et al. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell*, 2013, 152 (1/2): 290-303.
- [7] Wei J, Shimazu J, Makinistoglu M P, et al. Glucose uptake and Runx2 synergize to orchestrate osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 2015, 161 (7): 1576-1591.
- [8] Li Y, Su J, Sun W, et al. AMP-activated protein kinase stimulates osteoblast differentiation and mineralization through autophagy induction. *Int J Mol Med*, 2018, 41 (5): 2534-2544.
- [9] Lu D G, Lu M J, Yao S H, et al. Long non-coding RNA TUG1 promotes the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by regulating the AMPK/mTOR/autophagy pathway. *Biomed Res*, 2021, 42 (6): 239-246.
- [10] Tong X, Ganta R R, Liu Z. AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates autophagy, inflammation and immunity and contributes to osteoclast differentiation and function. *Biol Cell*, 2020, 112 (9): 251-264.
- [11] Cortizo A M, Sedlinsky C, McCarthy A D, et al. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *Eur J Pharmacol*, 2006, 536 (1/2): 38-46.
- [12] Cai Z Y, Yang B, Shi Y X, et al. High glucose downregulates the effects of autophagy on osteoclastogenesis via the AMPK/mTOR/ULK1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503 (2): 428-435.
- [13] 王焕珍, 柴艺汇, 陈云志, 等. 淫羊藿化学成分与药理作用研究进展. *亚太传统医药*, 2016, 12 (7): 63-65.
- [14] Siddiqi M Z, Siddiqi M H, Kim Y J, et al. Effect of fermented red ginseng extract enriched in ginsenoside Rg3 on the differentiation and mineralization of preosteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Med Food*, 2015, 18 (5): 542-548.
- [15] Zhang X, Huang F, Chen X, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates ovariectomy-induced osteoporosis via AMPK/mTOR signaling pathway. *Drug Dev Res*, 2020, 81 (7): 875-884.
- [16] Sun J, Pan Y, Li X, et al. Quercetin attenuates osteoporosis in orchietomy mice by regulating glucose and lipid metabolism via the GPRC6A/AMPK/mTOR signaling pathway. *Front Endocrinol*, 2022, 13 : 849544.
- [17] Men Z, Huang C, Xu M, et al. Zhuanggu Zhitong Capsule alleviates postmenopausal osteoporosis in ovariectomized rats by regulating autophagy through AMPK/mTOR signaling pathway. *Ann Transl Med*, 2022, 10 (16): 900.
- [18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部: 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [19] 陈知斌, 张文达, 胡美思, 等. 左、右归丸调控 AMPK/mTOR 信号通路促进绝经后骨质疏松症大鼠骨形成的研究. *中华中医药杂志*, 2021, 36 (6): 3584-3588.
- [20] 张文达, 胡美思, 任艳玲. 基于 AMPK/mTOR 信号通路探讨左、右归丸对绝经后骨质疏松症大鼠骨吸收的影响. *中华中医药杂志*, 2021, 36 (3): 1379-1383.

(收稿日期: 2023-04-16)

(本文编辑: 洪悦民)