

# 音猬因子信号通路与骨质疏松症关系的研究进展

许周媚<sup>1</sup> 王清辉<sup>1</sup> 查旋<sup>1</sup> 徐道华<sup>1,2,\*</sup>

1. 广东医科大学药理学教研室, 广东 东莞 523808

2. 广东医科大学中药与新药研究所, 广东 东莞 523808

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 04-0534-08

**摘要:** 骨发育的过程受到多种信号通路的调节, 如 Wnt、Notch、BMP、Hedgehog 信号通路等。Hedgehog 信号通路对骨形成的作用在过去的二十几年已经被证实。音猬因子(Sonic hedgehog, Shh)在 Hedgehog 家族中表达最广泛, 在该信号传导通路上对轴骨、四肢骨、颅面骨等骨骼的形成起着重要作用。骨质疏松症发病机制归根到底是成骨细胞的骨形成能力与破骨细胞的骨吸收之间的平衡被打破, 并且成骨细胞的骨形成作用下降是其主要影响因素之一。本文主要从分子水平对 Shh 信号通路与影响骨质疏松症发生的几个主要因素进行综述, 为 Shh 信号通路应用于骨质疏松的防治提供理论依据。

**关键词:** Sonic Hedgehog 信号通道; 骨质疏松; 成骨分化; 成脂分化

## Progress of the relationship between Sonic Hedgehog signaling and osteoporosis

XU Zhoumei<sup>1</sup>, WANG Qinghui<sup>1</sup>, ZHA Xuan<sup>1</sup>, XU Daohua<sup>1,2,\*</sup>

1. Department of Pharmacology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicine and New Pharmacy Development, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China

Corresponding author: XU Daohua, Email: daohuax108@163.com

**Abstract:** There are many pathways involved in bone development, such as Wnt, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathway. In the past 20 years, it has been proved that the Hedgehog signaling pathway is important in bone formation. Sonic hedgehog is the most widely expressed in the Hedgehog family, which is of great importance in the bone formation of axial skeleton, limb bone or craniofacial bone. The pathogenesis of osteoporosis in general is that the balance between bone formation and bone reabsorption is broken, with the decrease of osteoblast bone formation as one of the main reasons. This article reviews the relationship between sonic hedgehog and the main factors resulting in osteoporosis, in order to provide evidence for treating osteoporosis through the sonic hedgehog signaling pathway.

**Key words:** Sonic Hedgehog; Osteoporosis; Osteogenesis; Adipogenesis

骨质疏松症是一种以骨量减少、骨显微结构退化为特征, 致使脆性增加、易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病。其病理机制主要是成骨细胞的骨形成能力下降, 成脂分化增强, 破骨细胞的骨吸收活动增强, 导致骨代谢平衡被打破, 由此产生一系列的骨质疏松症状。Hedgehog 家族是一组分泌性的信号蛋白, 最早在 1980 年从果蝇体内发现并分离得到, 因 Hedgehog 的突变可使果蝇胚胎发育成毛团状, 酷似

刺猬, 故称为刺猬基因<sup>[1]</sup>。在哺乳动物体内有 3 种同源 Hedgehog 信号, Shh 在 Hedgehog 家族中表达最广泛, 与细胞在肢体、体节、神经管发育中的分化建立有关<sup>[2]</sup>, 与多种器官如脑、脊髓、肺脏、毛发、眼、颌面、牙和四肢等的形态形成有关, 与肿瘤发生也有关系<sup>[3-6]</sup>。研究证明, 随着衰老进程的推进, 骨骼中 Shh 信号表达水平也降低, Shh 信号通路在骨质疏松发病过程中具有重要作用<sup>[7]</sup>。因此, 本文拟对 Shh 信号通路与骨代谢的关系进行综述, 为 Shh 信号通路在骨质疏松症防治药物的研发提供理论依据。

## 1 Sonic hedgehog 信号通路发生和转导

### 1.1 Sonic hedgehog 蛋白的自动修饰

基金项目: 广东省科技计划项目(2013B031800013), 广东省自然科学基金(2014A030313534), 东莞市社会发展项目(2014108101052)

\* 通讯作者: 徐道华, Email: daohuax108@163.com

Shh 蛋白是 Shh 信号通路的启动蛋白,是该通路的重要组成部分之一。Shh 最初被编码成一个 45-kDa 的前体蛋白,经过分子内裂解成 Shh-C (26-kDa) 和 Shh-N (19-kDa) 两个部分<sup>[8]</sup>,其中 Shh-N 为活性调节部分,Shh-N 经胆固醇或棕榈酸(又称软脂酸)的共价修饰成为可溶解可扩散的脂质双分子形式“M-Shh-N”,即 Shh 蛋白发挥诱导作用的活性形式<sup>[9-10]</sup>。

### 1.2 Sonic hedgehog 信号通路的激活

Shh 信号通路的激活首先是“M-Shh-N”与 Ptc-Smo 异二聚体复合物受体结合。Patched (Ptc) 是一个 12 次跨膜蛋白,对 Hedgehog 信号通路起负性调节作用;Smoothened (Smo) 是一种特殊的 7 次跨膜蛋白,是激活 Hedgehog 信号传递必需的受体。当 Shh 与 Ptc 结合时,Smo 的抑制效应被解除,活化的 Smo 通过编码一些类似 G 蛋白偶联受体的跨膜蛋白启动 Shh 信号通路下游的一系列信号流,或者直接编码 Shh 信号的受体<sup>[11]</sup>,其产生的细胞内信号将通过调节几种蛋白酶激活一类核内转录因子, Cubitus interruptus (Ci) 蛋白和下游锌指转录因子 glioblastoma (Gli) 蛋白<sup>[12]</sup>,由此通路被激活。

### 1.3 Sonic hedgehog 信号通路的转导

Sonic hedgehog 信号的转导主要通过调节以下 4 部分极性因子实现信号的转导,包括 Ptc,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Fused (Fu),类运动蛋白 costal-2

(Cos-2), Ci。该信号通路的靶基因是分子量为 155kDa,具有细胞质锌指结构的 Ci 蛋白<sup>[13]</sup>。在脊椎动物中,Ci 蛋白又称 Gli 蛋白,分 Gli1, Gli2, Gli3 共 3 种,其中 Gli1 和 Gli2 对 Shh 通路起正性调节作用,而 Gli3 起负性调节作用<sup>[14]</sup>。Cos-2 是一种能与微管蛋白结合并能水解 ATP 的驱动蛋白样蛋白<sup>[15]</sup>,当其微管蛋白结合时,则阻止了全长 Ci 进入细胞核内。Fu 可以磷酸化结合 Cos-2,其抑制形式 SuFu (suppressor of fused) 可结合在 Ci 的 SuFu 结合位点上,实现对 Shh 通路的负性调节<sup>[16-17]</sup>。由此,当通路中编码的 Shh 蛋白不存在时,Fu, Cos-2 分别与 Ci 结合成复合物并结合在微管上,其中 Cos-2 将全长 Ci155 水解为非活性形式的 Ci75,导致 Ci 下游的转录受到抑制。当编码的 Shh 蛋白存在时,Shh 蛋白结合 Ptc 受体结合,从而释放其对 Smo 的抑制效应,活化的 Smo 将与 Fu, Cos-2 形成复合物,同时抑制 PKA 的活性,使得活性形式的全长 Ci155 进入细胞核,激活下游靶基因 (Ptc, Wg, Dpp 等) 的表达<sup>[18-19]</sup>。并且全长 Ci 还可下调原本有助于分别位于两细胞上的 Hedgehog 蛋白与受体 Ptc 结合的 iHog 和 CDO 在细胞膜上的表达,从而对 Hedgehog 蛋白有负反馈作用。值得注意的是,Hedgehog 信号的转导需要初级纤毛的参与,因为纤毛内蛋白在该通路的跨膜蛋白 Ptc 和 Smo 的转移以及靶基因 Ci 的表达中也同等重要<sup>[20-21]</sup>。见图 1。

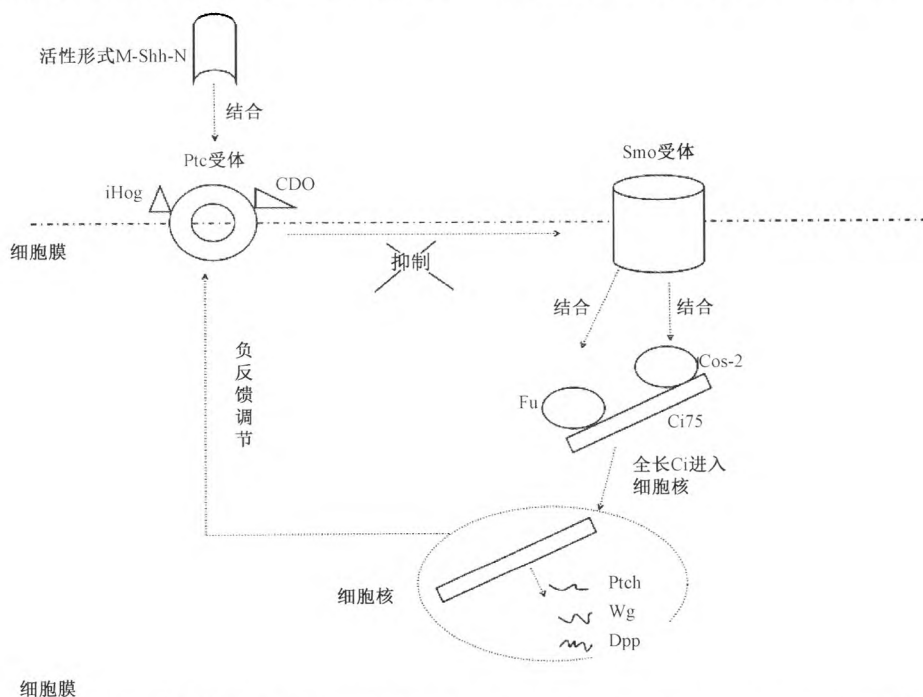


图 1 Sonic hedgehog 信号通路激活与转导

Fig. 1 The activation and transduction of sonic hedgehog signal pathway

## 2 Sonic hedgehog 信号通路对成骨作用的影响

### 2.1 Sonic hedgehog 对未分化的细胞及前体成骨细胞成骨分化的影响

目前,越来越多的实验证明,Shh 对多种细胞的成骨分化有促进作用,而抑制其成脂作用。如含转染能编码 N-Shh 基因的质粒的多能间充质细胞系 C3H10T1/2 细胞,其碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 和成骨标记基因骨钙素 (osteocalcin, OCN) 的表达水平升高,并且这种成骨分化的促进作用主要是通过上调骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMPs) 产生<sup>[22]</sup>。用 Shh 处理 C3H10T1/2 细胞发现 ALP 表达增强,同时 Hedgehog 信号通路中的必需受体 Ptc、Smo 以及靶基因 Gli 的表达明显增强<sup>[23]</sup>,说明 Shh 信号通路参与促进 C3H10T1/2 细胞成骨分化的过程。研究表明<sup>[24]</sup>,重组人 Shh 蛋白促进了未分化的 KS483 细胞系向成骨细胞分化。Shh 也能促进前体成骨细胞 MC3T3-E1 的增殖和分化<sup>[25]</sup>。

### 2.2 Sonic hedgehog 对成骨细胞成骨分化的影响

Hedgehog 信号通路与成骨细胞的增殖和分化过程密切相关。韩磊等<sup>[26]</sup>在体外分离和培养新生大鼠颅顶骨成骨细胞,发现 Hedgehog N 端重组蛋白 (N-Shh) 能促进原代成骨细胞的增殖和 S 期细胞比例增加,增强 ALP 的活性并促进 Hedgehog 通路特异性受体 Ptc 和 Smo 的表达,该通路抑制剂环巴胺则抑制原代成骨细胞的增殖和分化。Horikiri 等<sup>[25]</sup>发现,加入 Shh 可促使骨缺损部位进行骨重建,可能是因为 Shh 对成骨细胞的增殖和分化有促进作用。Jemtland 等<sup>[27]</sup>在原代成骨细胞的培养基中加入 N-Shh,可上调甲状旁腺相关肽 (parathyroid hormone-related peptide, PTHrP) 的表达及免疫 PTHrP (immunoreactive parathyroid hormone-related peptide, iPTHrP) 的分泌,从而诱导成骨分化;N-Shh 还可以增加 ALP 表达,矿化结节的形成增多,说明 N-Shh 可促进原代成骨细胞的骨形成作用,这个作用是通过上调 PTHrP 实现的。

### 2.3 Sonic hedgehog 对人骨髓间充质干细胞 (marrow mesenchymal stem cells, MSCs) 的影响

与上述实验研究结果不同,Shh 对人 MSCs 细胞的成骨诱导作用存在争议。Warzecha 等<sup>[28]</sup>发现用 Shh 处理人的 MSCs 细胞时,细胞表达出多种软骨分化阶段特征的标志:Sox9, CEP-裂能力,并且只有经

过 r-Shh 处理的人 MSCs 细胞表现出较强的分裂能力和更高的溴脱氧核苷尿嘧啶含量。Beloti 等<sup>[29]</sup>也发现 Hedgehog 通路激动剂 purmorphamine 能促进人 MSCs 细胞的成骨分化,增强 ALP 活性。然而也有研究发现 Hedgehog 信号的活化会抑制 MSCs 成骨分化。Plaisant 等<sup>[30]</sup>在培养人 MSCs 时,发现在成骨过程中 Smo 受体及 Gli 转录因子的表达明显减少,其作用机制可能与成骨分化标记转录因子 Runt-related transcription factor 2 (Runx2) 的下调有关。

### 2.4 Sonic hedgehog 对体内骨组织形成的影响

有研究证实在骨重建的位点上发现成骨细胞中的 Shh 信号通路被活化,Shh 信号通路通过调节成骨细胞的增殖、分化以及破骨细胞的形成影响骨折的愈合<sup>[30-31]</sup>。在头顶缺陷的兔子模型中移植经 Shh 转换的细胞可发现缺损处骨再生<sup>[33]</sup>。Krishnan 等<sup>[34]</sup>研究亦发现,Hedgehog 信号通路中的 Shh-N 可通过 BMP-4 和核心结合因子 (core binding factor alpha 1, Cbfa1) 介导新生小鼠跖骨中软骨内骨形成,促进骨的生长发育。史坚强<sup>[35]</sup>等证实 MSCs 复合 Shh 修饰的纳米晶胶原基骨 (nano hydroxyapatite/collagen, nHAC) 修复同种异体 SD 大鼠股骨缺损的效果明显优于单纯的 MSCs/nHAC 修复的效果,前者成骨较早且骨痂生成较多,能更快更有效地促进骨缺损的愈合,其成骨方式主要为软骨内成骨。最近研究表明<sup>[36]</sup>,在小鼠胫骨骨折发生后,可检测到 Hedgehog 信号通路的组成成分表达增加,从而增多骨痂的形成,促进骨折愈合。也有人发现 Gli 单倍剂量不足的小鼠表现出骨量的减少和成骨细胞分化的减弱,而破骨细胞的分化增加<sup>[37]</sup>。以上研究均表明了 Shh 对骨折愈合的重要性,但其具体作用机制未作具体探讨。

### 2.5 Sonic hedgehog 信号通路影响成骨分化的作用特点

在 Hedgehog 信号通路中,印度刺猬因子 (indian hedgehog, Ihh) 及 Shh 是调控肢体发育及成骨细胞分化的重要信号分子。Shh 是成骨细胞分化早期的关键信号之一,而 Ihh 主要参与分化晚期的调控,说明 Shh 信号的发挥是有限性的<sup>[38-39]</sup>。Shh 和 Ihh 都能刺激 C3H10T1/2 间充质细胞系向成骨细胞方向分化,但和 Ihh 相比,Shh 的诱导活性明显较强<sup>[40]</sup>。韩磊等<sup>[26]</sup>在体外培养大鼠成骨细胞,发现在成骨细胞体外生长过程中,Shh 的表达逐渐减弱,而 Ihh 的表达逐渐增强。进一步研究认为 Hedgehog 蛋白主要在成骨细胞分化的早期有促进作用,由于

随着成骨细胞的成熟 Hedgehog 信号逐渐减弱并在成骨细胞分化的晚期出现抑制作用<sup>[29]</sup>。但是以 Shh 及 Runx2 处理 MC3T3-E1 细胞后,其多种成骨相关蛋白的表达明显提高,而沉默 Runx2 基因后,这些因子的表达明显降低,表明在 Runx2 的介导下 Shh 也可促进成骨细胞的晚期成熟分化<sup>[41]</sup>。

另外,Hedgehog 蛋白的功能在不同物种间可能会存在较大差异。人类骨髓间充质干细胞的 Shh 信号对成骨分化作用显示出与动物种属不同的抑制效应,同一种属的细胞表现出促进或抑制的成骨分化作用,说明培养条件的不同也可能影响其作用结果。

此外,有研究表明,Shh 只是 Hedgehog 通路中的启动因子,不是作为成骨、成软骨的诱导剂发挥作用,而在其他成骨相关因子协助下可发挥作用。有人将 Shh-N 直接植入裸鼠发现植入部位既没有骨形成,也没有软骨形成。Yuasa 等<sup>[42]</sup>发现重组 N-Shh 是依赖 BMP-2 来诱导 MSCs 和 C3H10T1/2 细胞的成骨分化,将 BMP-2 移植到小鼠肌肉内可产生异位成骨,而单独移植 N-Shh 不出现此现象,表明 N-Shh 必须在 BMP-2 参与下才能诱发 MSCs 的成骨分化。进一步验证发现,加入外源性的重组鼠 N-Shh 能提高小鼠胚胎 C3H10T1/2 细胞对 BMP-2 的反应,成骨分化标记 ALP 活性增强;而给予 BMP 抑制剂 Noggin 解除 BMP-2 的诱导活性后,共转染 N-Shh 和 Noggin 却对 Shh 诱导的 ALP 表达无明显影响,说明 Shh 可直接作用于成骨细胞分化,但 BMP-2 对 N-Shh 的协同诱导作用具有一定的时效性<sup>[43-45]</sup>。

### 3 Sonic hedgehog 通路对脂肪组织形成的影响

在脂肪细胞中,Hedgehog 信号通路的多种组成成员,如受体 Ptc、Smo 及核内转录因子 Gli 均有表达,而且早期研究发现激活果蝇和线虫的 hedgehog 信号通路,体内的脂肪生长受到抑制,脂肪量下降。经 Shh 转基因的果蝇,肥胖不容易发生<sup>[46]</sup>。Pospisilik 等<sup>[47]</sup>通过建立 *sufu* 基因突变鼠发现激活 hedgehog 信号通路会特异性地抑制该鼠白色脂肪组织的发育,白色脂肪细胞的数量和大小明显下降。进一步研究发现,Shh 通路的活化会抑制多种间充质干细胞向脂肪细胞方向分化成熟,而有利于成骨细胞的分化。用 Shh 处理鼠间充质干细胞 KS384 和 C3H10T1/2,发现 Shh 能促进该细胞向成骨细胞方向分化,抑制其向脂肪细胞方向分化<sup>[40]</sup>;James 等<sup>[48]</sup>发现在成骨分化过程中,Hedgehog 信号通路

的相关蛋白 Shh、Ptc1 和 Gli1 的表达增加,而在脂肪分化过程中,上述通路蛋白的表达减少。并且 N-Shh 作用于脂肪来源的基质干细胞(mouse adipose-derived stromal cells, mASCs)可通过上调成骨标记基因 Runx2,最终导致 ALP 活性的增加和钙结节数量的增多,促使 mASCs 向成骨方向分化。

### 4 Sonic hedgehog 通路对破骨细胞的影响

研究表明<sup>[49-50]</sup>,激活成年大鼠成熟的成骨细胞 Hedgehog 通路,可同时使成骨细胞和破骨细胞增多,骨形成活跃的同时骨吸收作用也明显加强,最终出现骨质疏松;而抑制 Hedgehog 通路则使大鼠骨质丢失减少,表明 Hedgehog 信号参与调节破骨细胞的生成。Hedgehog 对破骨细胞的调节可通过多种途径作用,如核因子  $\kappa\beta$  受体活化因子配体(Ligand of receptor activator of nuclear factor kappa $\beta$ , RANKL)依赖途径,RANKL 是破骨细胞分化因子,Hedgehog 可通过上调 PTHrP 来调节 RANKL 的表达,从而诱导破骨细胞的成熟,促进重吸收的过程<sup>[51]</sup>。另外有实验证明,Shh 通过上调成骨特异性转录因子(Osterix, OSX)的表达来促进成骨细胞的形成,同时也间接地增加破骨细胞的活性,从而促进骨重吸收,导致骨强度的降低<sup>[52-53]</sup>。

### 5 Sonic hedgehog 信号通路异常可能导致的相关骨骼疾病

大量的研究证明,Hedgehog 信号通路在促进成骨细胞的增殖<sup>[54]</sup>、分化<sup>[55-57]</sup>,抑制脂肪细胞的形成<sup>[58]</sup>中扮演重要的角色,这就暗示了 Hedgehog 通路有调节骨强度的作用并可能对骨质疏松患者起到针对性的治疗作用。而当 Hedgehog 信号通路中的某个组件发生了突变,各种骨骼疾病也就应运而生。Shh 发生突变可能导致史李欧综合征,病人多以并指或多指为特征的骨骼畸形<sup>[59]</sup>。Patched homolog 1 (Ptc1)突变可能导致多发性基底细胞痣综合征,其发病主要以多指、异位骨形成、脊柱裂为特征的骨骼畸形<sup>[60-62]</sup>。而 VACTERL 综合征也被证明与 Gli2 和 Gli3 突变的突变有关,该病会引起脊柱缺损,四肢畸变<sup>[63]</sup>。全基因组关联研究已经证明 Hedgehog 信号对人的身高起着重要的调节作用,同时揭示 Shh 是多指症的一个重要调节信号<sup>[64-65]</sup>。

### 6 Sonic hedgehog 信号通路的兴奋剂和抑制剂

目前研究发现,Shh 通路特异性的兴奋剂和抑

制剂主要是作用于 Hedgehog 信号通路 Smo 受体及其下游的核内转录因子 Gli1 这两大类。20(S)-羟胆固醇和 22(R)-或 22(S)-羟胆固醇作用于骨髓基质干细胞表现出明显的成骨诱导作用,这种作用是通过增加成骨标记基因 Runx2、OCN 的表达,进而增加 ALP 活性以及矿化结节的形成<sup>[66-67]</sup>; Hh-Ag 1.3 和 Hh-Ag 1.7 均能特异性地激活内生性 Gli1 的表达,激活 Shh 通路从而剂量依赖性地增加 ALP 活性以及成骨标记基因的表达,最终促进间充质干细胞系 C3H10T1/2 的成骨分化作用<sup>[68]</sup>。这些通路激活剂有望开发成为临床上可用的治疗骨质疏松症的有效药物。

Shh 通路抑制剂中研究得比较多的是环巴胺类药物。其作用机制是通过与 Smo 受体结合,阻止 Smo 的磷酸化而阻断了下游完整 Gli 蛋白的产生,从而抑制 Hedgehog 信号通路,因此当 Smo 发生突变或者 Gli 蛋白下游有改变,环巴胺将无效。由于环巴胺的毒副作用比较多以及溶解度小、稳定性差等问题,限制了其在临床上的开发应用,因此人们进一步研究发现了有着更好酸稳定性和水溶性的环巴胺的半合成类似物 IPI-269609,此后,又经体内活性评价和药代评价优化合成了有望进入临床试验阶段的 IPI-926<sup>[69]</sup>。GDC-0449 是第一个合成并在 I 期临床试验中显示出良好的药效和药代动力学特征的 Smo 的抑制剂。在 1 例 26 岁转移性髓母细胞瘤患者治疗前获得的肿瘤样本中,发现 Hedgehog 信号通路被激活,而经 GDC-0449 治疗后,肿瘤体积缩小,症状也得到改善<sup>[70]</sup>。Hedgehog 信号通路抑制剂目前主要用于该信号过度表达时导致的肿瘤的治疗。

## 7 其他

目前,关于 Shh 通路与其他骨代谢相关的通路共同影响骨代谢的研究多集中在 BMPs 通路,BMPs 通路通常作为 Sonic hedgehog 信号通路的下游来调节软骨细胞的成骨分化<sup>[71]</sup>。也有人通过建立 Pth1 和  $\beta$ -Catenin 双重突变鼠发现此突变鼠的骨形成作用遭到破坏,说明作为 Hedgehog 信号通路下游,Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路在软骨内成骨过程中也可调节成骨分化<sup>[72]</sup>。另外,Hedgehog 信号通路的活化主要通过上调包括 Runx2、BMPs、SMADs、多种生长因子和整合素等与成骨分化相关的基因<sup>[73]</sup>来影响骨代谢的过程。

## 8 小结

总之,随着人口老龄化进程的推进,骨质疏松发

病率越来越高。对 Shh 信号通路研究的深入,不仅阐释了骨质疏松发生、发展以及修复的机制,而且为骨质疏松症的预防与治疗提供新途径。目前 Shh 信号通路对于是否有利于成骨细胞的分化成熟尚存在争议,但 Shh 信号通路在骨代谢平衡中的重要作用毋庸置疑,这可能与实验的条件、实验对象种属来源、给药剂量等有关;另一方面其也可能促进破骨分化的进程,因此在调节骨形成作用的同时是否会影响破骨的进程,仍需要进一步研究。但是 Shh 信号通路作用于 MSCs 细胞抑制成脂分化的作用较为确定,是否可通过利用间充质干细胞作为研究载体,研制出调节间充质干细胞向成骨细胞方向分化,促进骨形成作用,使骨重建重新达到平衡的药物,可能是未来骨质疏松治疗药物研发的一个重要研究思路。这也是当前 Hedgehog 信号通路的一个研究热点,然而对其具体作用机制以及体内整体药效学和药动学还有待进一步研究。

## 【参 考 文 献】

- [1] Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* [J]. *Nature*, 1980, 287 (5785): 795-801.
- [2] Capdevila J, Johnson RL. Hedgehog signaling in vertebrate and invertebrate limb patterning [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57 (12): 1682-1694.
- [3] Mill P, Mo R, Fu H, et al. Sonic hedgehog-dependent activation of Gli2 is essential for embryonic hair follicle development [J]. *Genes Dev*, 2003, 17(2): 282-294.
- [4] Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, et al. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer [J]. *Nature*, 2003, 422(6929): 313-317.
- [5] Kang DH, Han ME, Song MH, et al. The role of hedgehog signaling during gastric regeneration [J]. *J Gastroenterol*, 2009, 44(5): 372-379.
- [6] Harmon EB, Ko AH, Kim SK. Hedgehog signaling in gastrointestinal development and disease [J]. *Curr Mol Med*, 2002, 2(1): 67-82.
- [7] Dwyer JR, Sever N, Carlson M, et al. Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(12): 8959-8968.
- [8] Jiang SQ, Paulus H. A high-throughput, homogeneous, fluorescence polarization assay for inhibitors of hedgehog protein autoprocessing [J]. *J Biomol Screen*, 2010, 15(9): 1082-1087.
- [9] Hammond KL, Baxendale S, Mccauley DW, et al. Expression of patched, prdm1 and engrailed in the lamprey somite reveals conserved responses to Hedgehog signaling [J]. *Evol Dev*, 2009, 11(1): 27-40.

- [10] Zeng X, Goetz JA, Suber LM, et al. A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling [J]. *Nature*, 2001, 411(6838): 716-720.
- [11] Alcedo J, Ayzenzon M, Von Ohlen T, et al. The *Drosophila* smoothened gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal [J]. *Cell*, 1996, 86(2): 221-232.
- [12] Stern CD. Induction and initial patterning of the nervous system-the chick embryo enters the scene [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12(4): 447-451.
- [13] Chen CH, von Kessler DP, Park W, et al. Nuclear trafficking of *Cubitus interruptus* in the transcriptional regulation of Hedgehog target gene expression [J]. *Cell*, 1999, 98(3): 305-316.
- [14] Ehlen HW, Buelens LA, Vortkamp A. Hedgehog signaling in skeletal development [J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2006, 78(3): 267-279.
- [15] Kamal A, Goldstein LS. Principles of cargo attachment to cytoplasmic motor proteins [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2002, 14(1): 63-68.
- [16] Stone DM, Hynes M, Armanini M, et al. The tumour-suppressor gene *patched* encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog [J]. *Nature*, 1996, 384(6605): 129-134.
- [17] Choudhry Z, Rikani AA, Choudhry AM, et al. Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network [J]. *Ann Neurosci*, 2014, 21(1): 28-31.
- [18] Aza-Blanc P, Ramirez-Weber FA, Laget MP, et al. Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets *Cubitus interruptus* protein to the nucleus and converts it to a repressor [J]. *Cell*, 1997, 89(7): 1043-1053.
- [19] Fukumoto T, Watanabe-Fukunaga R, Fujisawa K, et al. The fused protein kinase regulates Hedgehog-stimulated transcriptional activation in *Drosophila* Schneider 2 cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 38441-38448.
- [20] Tzamelis I, Fang H, Ollero M, et al. Regulated production of a peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  ligand during an early phase of adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes [J]. *J Bio Chem*, 2004, 279(34): 36093-36102.
- [21] Ruat M, Roudaut H, Ferent J, et al. Hedgehog trafficking, cilia and brain functions [J]. *Differentiation*, 2012, 83(2): S97-104.
- [22] Spinella-Jaegle S, Rawadi G, Kawai S, et al. Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 11): 2085-2094.
- [23] Ingram WJ, Wicking CA, Grimmond SM, et al. Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells [J]. *Oncogene*, 2002, 21(53): 8196-8205.
- [24] Pathi S, Pagan-Westphal S, Baker DP, et al. Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog [J]. *Mech Dev*, 2001, 106(1-2): 107-117.
- [25] Horikiri Y, Shimo T, Kurio N, et al. Sonic hedgehog regulates osteoblast function by focal adhesion kinase signaling in the process of fracture healing [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76785.
- [26] 韩磊, 张晓玲, 李晖, 等. Hedgehog 通路对成骨细胞增殖和分化的作用 [J]. *上海口腔医学*, 2009(03): 287-290.  
Han L, Zhang XL, Li X, et al. Hedgehog pathway is associated with the proliferation and differentiation of osteoblasts [J]. *Shanghai Journal of Stomatology*, 2009, 18(3): 287-290. (in Chinese)
- [27] Jemtland R, Divieti P, Lee K, et al. Hedgehog promotes primary osteoblast differentiation and increases PTHrP mRNA expression and iPTHrP secretion [J]. *Bone*, 2003, 32(6): 611-620.
- [28] Warzecha J, Gottig S, Bruning C, et al. Sonic hedgehog protein promotes proliferation and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro [J]. *J Orthop Sci*, 2006, 11(5): 491-496.
- [29] Beloti MM, Bellesini LS, Rosa AL. Purmorphamine enhances osteogenic activity of human osteoblasts derived from bone marrow mesenchymal cells [J]. *Cell Biol Int*, 2005, 29: 537-541.
- [30] Plaisant M, Fontaine C, Cousin W, et al. Activation of hedgehog signaling inhibits osteoblast differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(3): 703-713.
- [31] Fuchs S, Dohle E, Kirkpatrick CJ. Sonic Hedgehog-mediated synergistic effects guiding angiogenesis and osteogenesis [J]. *Vitam Horm*, 2012, 88: 491-506.
- [32] Petrova R, Joyner AL. Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair [J]. *Development*, 2014, 141(18): 3445-3457.
- [33] Edwards PC, Ruggiero S, Fantasia J, et al. Sonic hedgehog gene-enhanced tissue engineering for bone regeneration. *Gene Ther*, 2005, 12: 75-86.
- [34] Krishnan V, Ma Y, Moseley J, et al. Bone anabolic effects of sonic /indian hedgehog are mediated by *bmp-2* /4-dependent pathways in the neonatal rat metatarsal model [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(2): 940-947.
- [35] 史坚强, 孙广友, 马鹏, 等. 骨髓间充质干细胞复合音猬因子/纳米晶胶原基骨修复骨缺损 [J]. *江苏大学学报*, 2009, 19(3): 206-209.  
Shi JQ, Sun GY, Ma P, et al. Mesenchymal stem cells recombine with Shh/nHAC to repair bone defect [J]. *Journal of Jiangsu University*, 2009, 19(3): 206-209. (in Chinese)
- [36] Baht GS, Silkstone D, Nadesan P, et al. Activation of hedgehog signaling during fracture repair enhances osteoblastic-dependent matrix formation [J]. *J Orthop Res*, 3 2014, 2(4): 581-586.
- [37] Kitaura Y, Hojo H, Komiyama Y, et al. Gli1 haploinsufficiency leads to decreased bone mass with an uncoupling of bone metabolism in adult mice. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109297.
- [38] Cai J Q, Huang YZ, Chen XH, et al. Sonic hedgehog enhances the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Cell Biol Int*, 2012, 36(4): 349-355.
- [39] Tu X, Joeng KS, Long F. Indian hedgehog requires additional effectors besides Runx2 to induce osteoblast differentiation [J].

- Dev Biol, 2012, 362(1): 76-82.
- [40] vander Horst G, Farhi-Sips H, Lowik CW, et al. Hedgehog stimulates only osteoblastic differentiation of undifferentiated KS483 cells[J]. Bone, 2003, 33(6): 899-910.
- [41] 徐莹,田野,孟凌新. Runx2 介导 Hedgehog 促进成骨细胞晚期分化的实验研究[J]. 生物医学工程与临床, 2013, 17(04): 384-388.
- Xu Y, Tian Y, Meng LX. Research of Hedgehog enhancing the late osteogenic induced by Runx2 [J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering and Clinical Medicine, 2013, 17(04): 384-388. (in Chinese)
- [42] Yuasa T, Kataoka H, Kinto N, et al. Sonic hedgehog is involved in osteoblast differentiation by cooperating with BMP-2 [J]. J Cell Physiol, 2002, 193(2): 225-232.
- [43] Long F, Chung UI, Ohba S, et al. Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton [J]. Development, 2004, 131(6): 1309-1318.
- [44] 徐晓峰,钱栋,马鹏,等. 骨形态发生蛋白 2 和音猬因子体外诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(36): 7093-7098.
- Xu XF, Qian D, Ma P, et al. BMP2 and sonic hedgehog induce the osteoblast differentiation of MSCs in vitro [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2009, 13(36): 7093-7098. (in Chinese)
- [45] Kim WK, Meliton V, Amantea CM, et al. 20 (S)-hydroxycholesterol inhibits PPARgamma expression and adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells through a hedgehog-dependent mechanism[J]. J Bone Miner Res, 2007, 22(11): 1711-1719.
- [46] Suh JM, Gao X, McKay J, et al. Hedgehog signaling plays a conserved role in inhibiting fat formation[J]. Cell Metab, 2006, 3(1): 25-34.
- [47] Pospisilik JA, Schramek D, Schnidar H, et al. Drosophila genome-wide obesity screen reveals hedgehog as a determinant of brown versus white adipose cell fate[J]. Cell, 2010, 140(1): 148-160.
- [48] James AW, Leucht P, Levi B, et al. Sonic Hedgehog influences the balance of osteogenesis and adipogenesis in mouse adipose-derived stromal cells[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(8): 2605-2616.
- [49] Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms [J]. Genes Dev, 2008, 22(18): 2454-2472.
- [50] Mundy GR, Yang X. Hedgehog coordination of postnatal osteoclast and osteoblast activities[J]. Dev Cell, 2008, 14(5): 637-638.
- [51] Mak KK, Bi Y, Wan C, et al. Hedgehog signaling in mature osteoblasts regulates bone formation and resorption by controlling PTHrP and RANKL expression[J]. Dev Cell, 2008, 14(5): 674-688.
- [52] Tian Y, Xu Y, Fu Q, et al. Osterix is required for Sonic hedgehog-induced osteoblastic MC3T3-E1 cell differentiation [J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 64(3): 169-176.
- [53] Kiuru M, Solomon J, Ghali B, et al. Transient overexpression of sonic hedgehog alters the architecture and mechanical properties of trabecular bone[J]. J Bone Miner Res, 2009, 24(9): 1598-1607.
- [54] Huycke TR, Eames BF, Kimmel CB. Hedgehog-dependent proliferation drives modular growth during morphogenesis of a dermal bone[J]. Development, 2012, 139(13): 2371-2380.
- [55] Wang W, Lian N, Ma Y, et al. Chondrocytic Atf4 regulates osteoblast differentiation and function via Ihh[J]. Development, 2012, 139(3): 601-611.
- [56] Felber K, Croucher P, Roehl HH. Hedgehog signalling is required for perichondral osteoblast differentiation in zebrafish [J]. Mech Dev, 2011, 128(1-2): 141-152.
- [57] Liu TM, Lee EH. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2013, 19(3): 254-263.
- [58] 蔡加琴,邓力. Hedgehog 信号通路对 MSCs 的调控[J]. 中国修复重建外科杂志, 2010(08): 993-996.
- Cai JQ, Deng L. Regulations of Hedgehog signaling pathway on mesenchymal stem cells[J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2010, 24(8): 993-996. (in Chinese)
- [59] Shefer S, Salen G, Batta AK, et al. Markedly inhibited 7-dehydrocholesterol-delta 7-reductase activity in liver microsomes from Smith-Lemli-Opitz homozygotes [J]. J Clin Invest, 1995, 96(4): 1779-1785.
- [60] Bale SJ, Amos CI, Parry DM, et al. Relationship between head circumference and height in normal adults and in the nevoid basal cell carcinoma syndrome and neurofibromatosis type I[J]. Am J Med Genet, 1991, 40(2): 206-210.
- [61] Gorlin RJ. Nevoid basal cell carcinoma syndrome[J]. Dermatol Clin, 1995, 13(1): 113-125.
- [62] Kimonis VE, Goldstein AM, Pastakia B, et al. Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome[J]. Am J Med Genet, 1997, 69(3): 299-308.
- [63] Rittler M, Paz JE, Castilla EE. VACTERL association, epidemiologic definition and delineation[J]. Am J Med Genet, 1996, 63(4): 529-536.
- [64] Lettre G, Jackson AU, Gieger C, et al. Identification of ten loci associated with height highlights new biological pathways in human growth[J]. Nat Genet, 2008, 40(5): 584-591.
- [65] Sun Y, Liu R, Zhao G, et al. Genome-wide linkage analysis and association study identifies loci for polydactyly in chickens[J]. G3 (Bethesda), 2014, 4(6): 1167-1172.
- [66] Kha HT, Basseri B, Shouhed D, et al. Oxysterols regulate differentiation of mesenchymal stem cells: pro-bone and anti-fat [J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(5): 830-840.
- [67] Richardson JA, Amantea CM, Kianmahd B, et al. Oxysterol-induced osteoblastic differentiation of pluripotent mesenchymal cells is mediated through a PKC- and PKA-dependent pathway [J]. J Cell Biochem, 2007, 100(5): 1131-1145.

(下转第 547 页)

- [52] Nauck M A, Del P S, Meier J J, et al. Dapagliflozin versus glipizide as add-on therapy in patients with type 2 diabetes who have inadequate glycemic control with metformin; a randomized, 52-week, double-blind, active-controlled noninferiority trial [J]. *Diabetes Care*, 2011, 34 (9):2015-2022.
- [53] Taylor S I, Blau J E, Rother K I. Possible adverse effects of SGLT2 inhibitors on bone [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2015, 3 (1):8-10.
- [54] Hernandez J L, Olmos J M, Romana G, et al. Bone turnover markers in statin users: a population-based analysis from the Camargo Cohort Study[J]. *Maturitas*, 2013, 75 (1):67-73.
- [55] Braatvedt G D, Bagg W, Gamble G, et al. The effect of atorvastatin on markers of bone turnover in patients with type 2 diabetes [J]. *Bone*, 2004, 35(3):766-770.
- [56] Ikeda T, Manabe H, Iwata K. Clinical significance of alendronate in postmenopausal type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabetes Metab*, 2004, 30(4):355-358.
- [57] Keegan T H, Schwartz A V, Bauer D C, et al. Effect of alendronate on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in type 2 diabetic women: the fracture intervention trial[J]. *Diabetes Care*, 2004, 27 (7):1547-1553.
- [58] Mori H, Okada Y, Kishikawa H, et al. Effects of raloxifene on lipid and bone metabolism in postmenopausal women with type 2 diabetes [J]. *J Bone Miner Metab*, 2013, 31 (1):89-95.
- [59] Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Are antiresorptive drugs effective against fractures in patients with diabetes? [J]. *Calcif Tissue Int*, 2011, 88 (3):209-214.

(收稿日期:2016-09-29,修回日期:2016-11-17)

## (上接第 540 页)

- [68] Nakamura T, Naruse M, Chiba Y, et al. Novel hedgehog agonists promote osteoblast differentiation in mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(4):922-929.
- [69] Stanton BZ, Peng LF. Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway[J]. *Mol Biosyst*, 2010, 6(1):44-54.
- [70] Rudin CM, Hann CL, Laterra J, et al. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(12):1173-1178.
- [71] Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, et al. Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(14):9924-9932.
- [72] Mak KK, Chen MH, Day TF, et al. Wnt/beta-catenin signaling interacts differentially with Ihh signaling in controlling endochondral bone and synovial joint formation [J]. *Development*, 2006, 133(18):3695-3707.
- [73] Oliveira FS, Bellesini LS, Defino HL, et al. Hedgehog signaling and osteoblast gene expression are regulated by purmorphamine in human mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113 (1):204-208.

(收稿日期:2016-09-14,修回日期:2016-10-23)