

骨 科 学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002689

间隙连接蛋白-43调控骨组织细胞间平衡在激素性股骨头坏死中的研究进展

赵 鑫, 陈长军, 李东海, 康鹏德

(四川大学华西医院骨外科, 成都 610041)

【摘 要】股骨头坏死是一种以股骨头内成骨细胞(osteoblast, OB)成骨活性降低, 破骨细胞(osteoclast, OC)破骨活性增大, 骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)成骨分化降低、成脂分化增强, 血管内皮细胞(endothelial cell, EC)受损、血供减少, 致使股骨头内骨代谢处于负平衡状态的一种骨代谢疾病。股骨头坏死与骨组织细胞间信息传递异常密切相关。缝隙连接(gap junction, GJ)是相邻细胞间进行信息传递的一种膜通道结构, GJ 在骨组织细胞间物质及信号传导通讯中起重要调控作用。通过 GJ 进行缝隙连接细胞通讯对上述骨代谢动态平衡具有重要作用; 间隙连接蛋白-43(connexin 43, Cx43)是骨组织 GJ 中的重要组分。因此, GJ 介导的细胞间信息传递与股骨头坏死等骨代谢疾病的发生密切相关。本文从 GJ 及 Cx43 在激素性股骨头坏死疾病中的研究进展作一综述。

【关键词】缝隙连接; 间隙连接蛋白-43; 糖皮质激素; 股骨头坏死; 骨代谢

【中图分类号】R68

【文献标志码】A

【收稿日期】2020-06-19

Research progress of connexin 43 regulating intercellular balance of bone tissue in glucocorticoids-induced osteonecrosis of the femoral head

Zhao Xin, Chen Changjun, Li Donghai, Kang Pengde

(Department of Orthopedic Surgery, West China Hospital, Sichuan University)

【Abstract】Osteonecrosis of femoral head (ONFH), a kind of bone metabolic disease, is featured by reduced osteogenic activity of osteoblasts (OB), increased osteoclast activity of osteoclasts (OC), decreased bone marrow stromal cells (BMSCs) osteogenic differentiation with enhanced adipogenic differentiation, disrupted vascular endothelial cells, and dropped blood supply, resulting in a negative balance of bone metabolism in the femoral head. ONFH is closely related to the abnormal intercellular communication of bone tissue. Gap junction (GJ) is a membrane channel structure for intercellular communication between adjacent cells, and GJ plays an important regulatory role in substance exchange and signal transduction between bone tissue and cells. Communication of gap junction cell through GJ plays an important role to keep the dynamic balance of bone metabolism. Connexin 43 (Cx43) is an important component of GJ in bone tissue. Therefore, GJ-mediated intercellular communication is closely related to the occurrence of bone metabolic diseases such as ONFH. This paper reviews the research progress of GJ and Cx43 roles in the diseases of glucocorticoids-induced ONFH.

【Key words】gap junction; connexin 43; glucocorticoids; osteonecrosis of the femoral head; bone metabolism

股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)是一种常见的难治性骨科疾病, 好发于中青年人群^[1]。目前普遍认为长期大剂量使用糖皮质激素(glucocorticoids, GCs)是诱

发 ONFH 的主要病因之一, 接受大剂量或长期使用 GCs 的人群有 9%~40% 发生 ONFH^[2]。近年来国内外学者在 ONFH 病因、发病机制、预防、早期治疗方面做了大量工作, 但由于 GCs 诱发 ONFH 的病理机制仍不清楚, 由此给临床 ONFH 的预防、早期治疗带来极大难度, 使各种治疗方法效果欠佳, 病情进展导致股骨头塌陷, 继发骨关节炎, 不得不接受全髋关节置换进行治疗, 同时也给患者带来严重的经济和心理负担。因此, 研究 ONFH 病因和发病机制、探索 ONFH 预防与早期治疗方法、避免股骨头塌陷是至关重要的课题。

作者介绍:赵 鑫, Email: zhaoxin5670@126.com,

研究方向: 骨科基础与临床研究。

通信作者:康鹏德, Email: Kangpengde1969@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号: 81974333)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20201104.1717.020.html>

(2020-11-05)

1 激素性股骨头坏死

目前关于 GCs 诱发 ONFH 的病理机制已提出多种学说,包括骨内高压学说、凝血机制改变学说、脂质代谢紊乱学说、骨质疏松学说、骨细胞凋亡学说等,但均不能完全解释 ONFH 的全部病理生理过程^[3-5]。国内外学者和既往研究表明,GCs 诱发 ONFH 的发生、发展,与超生理剂量 GCs 诱导骨组织细胞间平衡失调密切相关,在 GCs 等相关因素作用下股骨头内成骨细胞(osteoblast,OB)成骨活性降低,破骨细胞(osteoclast,OC)破骨活性增大,骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal stem cells,BMSCs)成骨分化降低、成脂分化增强,内皮细胞(endothelial cell,EC)损伤,血供减少,使股骨头内骨代谢处于负平衡状态,进而发生股骨头塌陷^[6-9]。

GCs 作用下,骨组织细胞间正常连接机制、信号传递被阻断或破坏,骨细胞、OB 不能根据外界刺激有序修复、重塑股骨头内正常结构,股骨头内力学性能不能有效重建、无法恢复正常股骨头力学支撑结构,在外界压力作用下导致发生骨坏死和塌陷^[10-11]。因此,研究 GCs 对骨组织细胞间正常平衡的破坏、对细胞间正常信号传递的影响,进而研究重建细胞间正常信号网络、重建细胞间连接网络以对抗 GCs 对骨组织细胞间平衡的破坏,从而探索新的方法来促进骨修复,对 GCs 诱发 ONFH 的病理机制、早期诊断与预防治疗提供理论依据,具有重要的理论和实际意义。

2 骨组织细胞间平衡与股骨头坏死

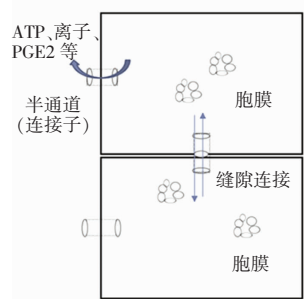
骨组织细胞网络结构是持续动态调控、维护骨重建和塑形、保障成骨与破骨平衡的重要调控因素^[12]。正常骨结构的维护及骨重建需要维持骨形成和骨吸收的动态平衡;骨内组织各种细胞(骨细胞、OB、OC、脂肪细胞、BMSCs、EC 等)间不是彼此孤立的。它们相互连接、相互传递各种细胞信号,共同构成完整的骨细胞网络结构,维持骨组织正常代谢与骨结构^[13-14]。正常情况下,骨基质内的骨细胞间依靠缝隙连接(gap junction,GJ)构成树枝状的网络结构,可以迅速将外界刺激(如力学刺激、激素水平改变、药物作用等)传递到周围及远处的其他骨组织细胞,使骨组织细胞网络协同发挥响应刺激作用^[15-16]。与此同时,骨细胞伸出突触与骨表面的 OB 相连接,而 OB 与其前体细胞 BMSCs 之间同样存在广泛连接网络。外界刺激从骨细胞传到 OB 时,OB 及其前体细胞成骨分化、成骨活性发生变化,成骨活性增强或抑制,完成外界刺激下骨组织的修复^[13,17]。OB 和破骨细胞(osteoclast,OC)间同样存在细胞连接并维持骨形成和骨吸收的动态平衡,两者之间的网络连接控制 OB-OC 基本多细胞单元(basic multicellular units,BMUs)的成骨活性,当 2 种细胞间连接减少,OC 活性增加,两者间连接增多时,OC 活性受到抑制,BMUs 成骨活性增加^[18-19]。骨内细胞环境中接受外界刺激,如 PTH 或二磷酸盐药物作用时,OB-OC 连接增多,OB 分泌破骨细胞抑制因子如骨保护素(osteoprotegerin,OPG),OC 活性受抑制,体内成骨活性大于破骨^[19-20]。

生理情况下,骨内细胞网络系统在响应外界刺激(物理刺激、化学刺激、生物学刺激)时具有重要作用,维持成骨和破骨的动态平衡,调节骨修复和重塑;而在病理情况下,骨基质内的骨细胞间细胞连接遭到破坏,细胞连接减少,不能有效响应外界刺激,骨生成和骨吸收动态平衡被打破,从而使 OB 成骨活性下降,OC 破骨活性增加,骨吸收大于骨生成,从而导致骨量减少,最后导致骨质疏松甚至骨坏死等骨代谢相关疾病发生。

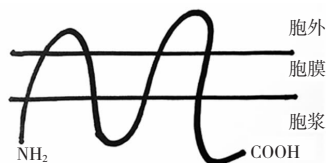
3 细胞缝隙连接与骨代谢

骨组织受到成骨与破骨的动态调节,通过细胞间的相互作用来协调骨组织的生成、重塑和修复。骨组织细胞间形成广泛的细胞连接网络。嵌入骨组织的骨细胞通过长树突骨管系统与骨表面成骨细胞和骨祖细胞相互连接。在骨组织受到外界刺激(如力学刺激、激素水平改变、药物作用等)情况下,骨组织细胞间通过细胞连接传递信号,介导成骨细胞和破骨细胞活性改变,从而促进或抑制骨生成和骨吸收过程;进而完成骨生成和骨重塑,严密控制骨重塑过程。

GJ 介导的细胞间通讯是细胞生长和分化的重要调节因素;骨组织网络结构的信息传递依赖 GJ^[11]。GJ 作为一种特殊的跨膜通道,由相邻细胞膜上的 2 个连接子配对连接而成,单独的连接子也叫作半通道^[11,21]。GJ 和半通道均能允许小的分子、离子及第二信使(如 ATP、PGE2 等)在细胞间或细胞与胞外环境之间进行传递(图 1A),从而调控细胞的生长代谢、增殖和分化等生理过程^[22-23]。



A. 细胞缝隙连接是相邻细胞膜上的 2 个连接子配对连接而成,单独的连接子即为半通道



B. 连接蛋白长链跨膜结构示意图

图 1 缝隙连接和连接蛋白示意图

由连接蛋白构成的缝隙连接不仅发生在骨表面的成骨细胞和骨祖细胞之间,也发生在骨基质内骨细胞之间及骨细胞与骨表面成骨细胞或骨祖细胞之间。这样骨组织局部在接受外界刺激时,就能向周围及远处的细胞快速发散信号,迅速

作出回应,以适应外界条件的改变,形成一个具有自我调节能力的骨组织细胞网络。正是通过这种细胞网络,信息能够在细胞之间以间隙连接依赖的方式传递,从而影响骨形成和骨吸收过程,最终调控骨的质量。当外界刺激超过骨组织细胞网络自我调节能力范围后,细胞连接减少,骨组织细胞网络结构被破坏,骨组织代谢出现负平衡,骨生成能力下降,骨吸收增强,从而引起骨量丢失。

4 Cx43 与骨代谢

GJ 和半通道的基本构成单体是间隙连接蛋白(connexins, Cxs),一个连接子(半通道)是由 6 个连接蛋白相互聚集构成^[24]。目前在人类基因组中已发现 21 个不同亚型的 Cxs,所有的 Cxs 均经历 4 次跨膜,包含 2 个胞外环、1 个胞内环、胞内的 1 个羧基端和 1 个氨基端(图 1B)。Cx 是一个相对保守的蛋白家族,依据其自身分子量来命名,如 Cx32、Cx43、Cx45 等。Cx43 是骨组织 GJ 中最主要的细胞连接蛋白^[12]。研究表明,骨组织中各个骨骼细胞(成骨细胞、骨细胞、破骨细胞和软骨细胞等)中均表达 Cx43,Cx43 介导的缝隙连接作为骨组织细胞间信息转导的结构基础,能够直接调控骨组织细胞间的信息传递^[25]。有研究发现,Cx43 在 BMSCs 中也存在表达,由 Cx43 介导的 GJIC 在 BMSCs 增殖和分化中具有重要调控作用^[26]。关于连接蛋白特别是 Cx43 对骨组织功能影响的研究,多数来自动物模型中进行的一些功能缺失研究。Lecanda F 等^[27]的研究表明,在 Cx43 基因缺陷小鼠模型中,小鼠的全身骨骼发生功能障碍,骨骼矿化明显延迟,并出现颅骨畸形;Gregory M 等^[28]发现 Cx43 基因突变的小鼠出现并指(趾)畸形、釉质发育不全及面颅骨畸形等眼-齿-指(趾)发育不良综合征(oculodentodigital dysplasia syndrome,ODDD)的表现;此外,在斑马鱼的研究中,证实 Cx43 与骨骼的体积和长度存在紧密关系^[29-30]。上述均证实连接蛋白 Cx43 与骨骼的正常发育密切相关。为评估出生后 Cx43 缺失对骨组织表型的影响,有学者采用 4 种不同的启动子生成了 Cx43 条件敲除小鼠模型。研究发现,Cx43 条件敲除小鼠中的软骨内和膜内骨化明显延迟,颅面出现异常;分离 Cx43 条件敲除小鼠 OB 细胞并体外培养,发现其成骨分化及矿化能力明显下降^[12]。

Cx43 不仅介导细胞网络结构的形成,参与骨组织对不同刺激的响应,调控骨细胞活性、OB 分化及成骨活性表达,达到骨正常稳态的维护与损伤的修复、重塑,同时抑制 OC 分化与活性表达,抑制骨吸收^[31-32]。Cx43 促进 OB 及其前体细胞成骨分化,上调成骨相关因子 RUNX2、ALP 等的表达,促进 OB 钙结节形成与 BMSC 成骨分化;同时抑制破骨细胞因子 RANKL 表达,抑制 OC 破骨活性^[33-35]。其中 Runx2 是一种重要的调控成骨的因子,也是与 Cx43 成骨活性密切相关的因子,Cx43 活性增强时可介导 Runx2 表达增多,促进骨的正向调控。有报道称,Cx43 磷酸化水平增高,能够激活 MEK/ERK1/2 通路,使胞浆内磷酸化的 ERK1/2 表达上调并进入细胞核,促进合成下游调控因子 Runx2、ALP、OPG 表达,调控与促进 OB、BMSCs 成骨分化及活性表达,同时抑制 RANKL 的表达,并且 OPG 可与 RANKL 竞争性结合受体从而能有效阻断 RANKL/

RANK 信号通路,抑制 OC 分化与活性表达,抑制 OC 介导的骨吸收,使骨内成骨大于破骨^[35-36]。

体内血管生成与骨再生密切相关,而连接蛋白在血管生成相关的生理或病理过程中同样发挥重要作用。Bellafore M 等^[37]报道称,小鼠经过 30 d 运动后,Cx43 表达上调与心脏局部毛细血管密度增加密切相关。Gärtner C 等^[38]发现,通过 siRNA 下调 HUVECs 中 Cx43 的表达,其血管分支数量及长度均显著下降;下调 Cx43 表达,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)表达下降,新生血管生成显著减少;通过 Lucifer 染液转移实验证实连接蛋白的表达水平与细胞间隙连接细胞通讯紧密相关;利用缝隙连接通道阻滞剂棕榈油酸处理 HUVECs,其血管生成能力显著下降^[38];这说明血管新生与连接蛋白表达水平及半通道和 GJ 通道开放水平紧密相关;Cx43 敲除小鼠的冠状动脉远端分支数量显著减少,冠状动脉疾病发生率明显提高^[39]。研究发现,Cx43 突变可以导致左心发育不良综合征^[40];而血管的新生与骨再生密切相关,新生血管的减少进一步加剧骨量的丢失;因此认为,Cx43 的表达及细胞连接与骨代谢平衡紧密相关。但半通道或 GJ 通道开放水平的下降是如何影响血管新生的呢?

骨组织的正常发育和重塑依赖骨组织各种细胞之间的相互作用,内皮细胞是血管生成的关键细胞,在骨代谢过程中起非常重要的调控作用。充分了解血管生成细胞 ECs 和成骨细胞或间充质干细胞之间的相互作用是进行体内实验的前提。然而,成骨细胞和内皮细胞之间的相互作用分子机制及对内皮细胞血管化的影响尚不清楚。成骨细胞和血管内皮细胞之间不仅可以通可溶性旁分泌因子,还可以通过细胞连接进行连接通信^[41]。已证实细胞因子 VEGF 是通过缝隙连接进行分泌进而发挥促成管的作用^[42]。Cx43 是成骨细胞中的一种重要缝隙连接蛋白,有研究证实 OB 与 VECs 之间可以形成 GJ,从而介导细胞分化。采用 18 α -甘草次酸抑制 GJ 能够显著降低 HUVECs 和 OB 共培养体系下的 OB 成骨分化能力^[43]。另有研究显示,HUVECs 和骨祖细胞短期共培养后,细胞之间可以形成 GJ,且 Cx43 能够促进碱性磷酸酶 ALP 的合成^[44]。此外,Herzog DP 等^[45]发现在内皮细胞和成骨细胞直接接触的细胞共培养体系中,内皮细胞成管能力和成骨细胞的成管分化水平均与细胞缝隙连接有关。而骨代谢过程始终伴随新骨的生成和内皮细胞的血管化。因此,骨组织代谢与细胞缝隙连接及 Cx43 的表达均紧密相关。

5 细胞连接与 PGE2

骨组织代谢活动贯穿整个生命过程,不断受到骨重塑的影响,维持骨组织成骨与破骨之间的平衡^[46]。GCs 过量应用严重影响了骨代谢过程,使骨组织出现负平衡,造成骨量下降^[9]。已有研究表明,机械力的刺激能够产生信号分子,通过 GJ 在细胞之间及通过半通道(hemichannels,HC)在细胞和细胞外基质之间进行传递,并发挥相应的功能,调控骨细胞的生物学功能^[47]。研究表明,在机械外力作用下,MLO-Y4 细胞中前列腺素 E2(prostaglandin,PGE2)通过 HC 向胞外释放增多,且上调 Cx43 表达,细胞半通道开放水平也相应增加,

PGE2 作为第二信使释放量也相应增加^[48]。而 PGE2 能够调控骨的形成,骨折后局部内源性 PGE2 增加,而抑制 PGE2 产生会影响骨折愈合^[49]。同样有研究指出,局部注射 PGE2 可以促进骨的形成^[50]。PGE2 能够通过活化骨细胞 EP2 受体激活 PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin,促进 Cx43 及 Runx2 等成骨因子的表达,细胞间隙连接也相应增多,半通道开放相应增多, PGE2 作为第二信使在细胞与胞外环境的传递就相应增加^[48]。此外, PGE2 能够通过内皮细胞膜 EP4 受体激活 PKC 通路促进血管新生^[51]。因此,骨组织网络结构的维护依赖 Cx43 的正常表达,任何影响 Cx43 表达的因素均能通过影响 Cx43 磷酸化水平及 PGE2 的释放来影响成骨和破骨平衡,进而影响骨组织网络正常结构。

Cx43 是一种细胞膜通道蛋白,是构成、维护骨组织内细胞间网络结构的关键蛋白,容易受细胞微环境变化,影响其合成、表达及功能。Cx43 的正常表达及活性有助于维持骨组织的重塑,而异常表达的 Cx43 会导致骨疾病发生。在骨组织中, Cx43 主要由 OB 和骨细胞合成,多种刺激(如酶、物理刺激等)可通过转录因子(如 SP-1、SP-3、AP-1、c-Jun 等)启动 Cx43 基因的表达^[52]。Cx43 在内质网上完成初步组装,然后转运至高尔基复合体,最后在细胞膜上聚集形成细胞连接^[53]。Cx43 转录受多种因素调控,具体机制不明,但是转录后翻译主要受 PI3K/Akt 信号通路调节。超生理剂量 GCs 不仅引起骨代谢异常,还会通过下调 PI3K/Akt 通路抑制 Cx43 活性,阻碍 Cx43 的合成及磷酸化^[54-55],进而影响半通道的开放及 PGE2 的胞外释放。在 GCs 作用下, GCs 与骨细胞膜上的激素受体结合,抑制 PI3K 的调节亚基 p85 招募催化亚基 p110,使膜表面的磷脂酰肌醇二磷酸[phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate, PIP2]不能合成促进 Akt 磷酸化的第二信使磷脂酰肌醇 3-磷酸[phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate, PIP3], PI3P

缺乏导致 Akt 第 308 位点的苏氨酸磷酸化受阻,使胞浆内去磷酸化 Akt 增加,而去磷酸化 Akt 不能有效抑制 GSK3 β ,进而导致 β -catenin 降解增多, β -catenin 入核减少^[56-58]。其结果是:一方面, β -catenin 活性降低下游效应因子不能被激活,不能启动 mRNA 5'端翻译,导致蛋白翻译障碍、Cx43 合成减少;另一方面,去磷酸化 Akt 无法与 Cx43 第 369 位或第 373 位丝氨酸(Ser)残端结合,使 Cx43 磷酸化水平降低。Cx43 去磷酸化后细胞通道关闭, PGE2 释放减少, Cx43 蛋白从细胞膜上内陷入细胞内^[54]。当超生理剂量的 GCs 通过 PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin 通路使 Cx43 去磷酸化, Cx43 活性降低后,抑制 MEK/ERK1/2 信号通路活性, MRK 和 ERK1/2 磷酸化水平降低,使磷酸化的 ERK1/2 进入细胞核减少,不能启动下游介导的 Runx2、OPG 的翻译和磷酸化,而非磷酸化的 ERK1/2 促进了 RANKL 活性表达,导致 OB 和 BMSCs 成骨分化降低, OC 破骨活性增强,导致骨代谢异常,骨组织新生骨减少^[36,59](图 2)。

正常表达的 Cx43 通过自身磷酸化水平的改变,响应外界微环境成骨和破骨的信号,进而调控合成和释放相关因子在正常骨组织细胞平衡等生理过程中具有重要地位。而在高剂量激素作用下, Cx43 活性下调,细胞间通道关闭, PGE2 胞外释放减少, EP2 和 EP4 受体不能被有效激活,而 EP2 和 EP4 受体分别与 OB 及 BMSCs 细胞成骨活性和内皮细胞血管化水平相关,从而严重破坏机体正常骨稳态环境,使股骨头内骨代谢处于负平衡状态,进而发生股骨头塌陷。

综上所述,过量使用 GCs 通过抑制 OB 成骨活性及 BMSCs 成骨分化和 ECs 血管化导致骨坏死的发生,其机制为:在大剂量糖皮质激素作用下,通过抑制膜表面 PI3K 磷酸化进而抑制 Akt 磷酸化水平, β -catenin 胞内降解增加,入核减少, Runx2 等成骨因子的表达下降,抑制 OB 成骨活性和 BMSCs

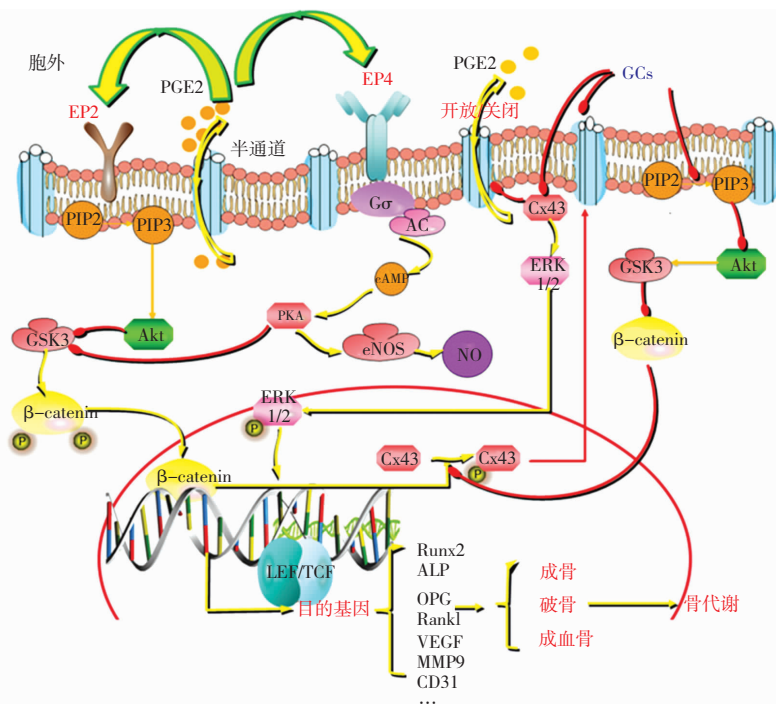


图2 GCs作用下, Cx43 调控骨代谢相关信号通路图

成骨分化,上调 OC 破骨活性,进而诱发骨坏死;此外, β -catenin 活性下降,Cx43 的合成及磷酸化水平也相应下降,细胞间的连接减少,骨组织细胞网络结构遭到破坏;同时,Cx43 表达水平下降,由其构成的半通道开放水平下降,PGE2 胞外释放减少,EP2 和 EP4 受体不能有效被激活,受损组织的成骨成血管水平也就相应下降。因此,PGE2 的释放减少可导致成骨成血管水平下降进而介导骨坏死的发生。因此本研究团队认为 GCs 诱发 ONFH 可能与 Cx43 表达下降进而抑制 PGE2 的胞外释放有关。这为 Cx43 及 GJ 对股骨头坏死的发病机制研究提供了一种新的研究方向。

6 总 结

Cx43 及 GJ 介导的缝隙连接细胞通讯是维护骨组织细胞间平衡的重要信号和物质交流方式之一。目前,Cx43 在股骨头坏死方面的研究仍比较少,且大部分均处于基础研究和动物实验阶段,应用于临床还要经历很长的时间。随着研究的不断深入,本研究团队认识到 Cx43 介导骨组织细胞平衡与股骨头坏死的发生发展有紧密的关联。因此,深入研究 Cx43 及 GJ 介导缝隙连接细胞通讯的调控机制,将为股骨头坏死及骨代谢相关疾病的研究和治疗提供新的治疗方向。

参 考 文 献

- [1] Yang Z, Liu H, Li D, et al. The efficacy of statins in preventing glucocorticoid-related osteonecrosis in animal models: a meta-analysis[J]. *Bone Joint Res*, 2016, 5(9): 393–402.
- [2] Murakami J, Ishii M, Suehiro F, et al. Vascular endothelial growth factor-C induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through the ERK and RUNX2 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484(3): 710–718.
- [3] Kang P, Gao H, Pei F, et al. Effects of an anticoagulant and a lipid-lowering agent on the prevention of steroid-induced osteonecrosis in rabbits[J]. *Int J Exp Pathol*, 2010, 91(3): 235–243.
- [4] Xie XH, Wang XL, He YX, et al. Promotion of bone repair by zimplantation of cryopreserved bone marrow-derived mononuclear cells in a rabbit model of steroid-associated osteonecrosis[J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(5): 1562–1571.
- [5] Kang P, Xie X, Tan Z, et al. Repairing defect and preventing collapse of femoral head in a steroid-induced osteonecrotic of femoral head animal model using strontium-doped calcium polyphosphate combined BM-MNCs[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2015, 26(2): 80.
- [6] Hong YC, Luo RB, Lin T, et al. Efficacy of alendronate for preventing collapse of femoral head in adult patients with nontraumatic osteonecrosis[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 716538.
- [7] Gianakos AL, Moya-Angeler J, Duggal S, et al. The efficacy of bisphosphonates with core decompression and mesenchymal stem cells compared with bisphosphonates alone in the treatment of osteonecrosis of the hip: a retrospective study[J]. *HSS J*, 2016, 12(2): 137–144.
- [8] Kubo T, Ueshima K, Saito M, et al. Clinical and basic research on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in Japan[J]. *J Orthop Sci*, 2016, 21(4): 407–413.
- [9] Gangji V, Soyfoo MS, Heuschling A, et al. Non traumatic osteonecrosis of the femoral head is associated with low bone mass[J]. *Bone*, 2018, 107: 88–92.
- [10] Liu G, Luo G, Bo Z, et al. Impaired osteogenic differentiation associated with connexin 43/microRNA-206 in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head[J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 101(1): 89–99.
- [11] Moorer MC, Stains JP. Connexin 43 and the intercellular signaling network regulating skeletal remodeling[J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2017, 15(1): 24–31.
- [12] Watkins M, Grimston SK, Norris JY, et al. Osteoblast connexin 43 modulates skeletal architecture by regulating both arms of bone remodeling[J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(8): 1240–1251.
- [13] Plotkin LI. Connexin 43 hemichannels and intracellular signaling in bone cells[J]. *Front Physiol*, 2014, 5: 131.
- [14] Zappitelli T, Aubin JE. The “connexin” between bone cells and skeletal functions[J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(10): 1646–1658.
- [15] Plotkin LI, Bellido T. Beyond gap junctions: connexin 43 and bone cell signaling[J]. *Bone*, 2013, 52(1): 157–166.
- [16] Xu H, Gu S, Riquelme MA, et al. Connexin 43 channels are essential for normal bone structure and osteocyte viability[J]. *J Bone Miner Res*, 2015, 30(3): 436–448.
- [17] Stains JP, Civitelli R. Connexins in the skeleton[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 50: 31–39.
- [18] Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, et al. Pulsed electromagnetic fields affect phenotype and connexin 43 protein expression in MLO-Y4 osteocyte-like cells and ROS 17/2.8 osteoblast-like cells[J]. *J Orthop Res*, 2003, 21(2): 326–334.
- [19] Furuya M, Kikuta J, Fujimori S, et al. Direct cell-cell contact between mature osteoblasts and osteoclasts dynamically controls their functions *in vivo*[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 300.
- [20] Schiller PC, Roos BA, Howard GA. Parathyroid hormone up-regulation of connexin 43 gene expression in osteoblasts depends on cell phenotype[J]. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(12): 2005–2013.
- [21] Nielsen BS, Zonta F, Farkas T, et al. Structural determinants underlying permeant discrimination of the Cx43 hemichannel[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(45): 16789–16803.
- [22] Genetos DC, Kephart CJ, Zhang Y, et al. Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 212(1): 207–214.
- [23] Sáez JC, Contreras-Duarte S, Gómez GI, et al. Connexin 43 hemichannel activity promoted by pro-inflammatory cytokines and high glucose alters endothelial cell function[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1899.
- [24] Donahue HJ, Qu RW, Genetos DC. Joint diseases: from connexins to gap junctions[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 14(1): 42–51.
- [25] Plotkin LI, Stains JP. Connexins and pannexins in the skeleton: gap junctions, hemichannels and more[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(15): 2853–2867.
- [26] Dorshkind K, Green L, Godwin A, et al. Connexin-43-type gap junctions mediate communication between bone marrow stromal cells[J]. *Blood*, 1993, 82(1): 38–45.
- [27] Lecanda F, Warlow PM, Sheikh S, et al. Connexin 43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction[J]. *J Cell Biol*, 2000, 151(4): 931–944.

- [28] Gregory M, Kahiri CN, Barr KJ, et al. Male reproductive system defects and subfertility in a mutant mouse model of oculodentodigital dysplasia[J]. *Int J Androl*, 2011, 34(6 Pt 2): e630–e641.
- [29] Iovine MK, Higgins EP, Hindes A, et al. Mutations in connexin 43 (GJA1) perturb bone growth in zebrafish fins[J]. *Dev Biol*, 2005, 278(1): 208–219.
- [30] Misu A, Yamanaka H, Aramaki T, et al. Two different functions of connexin 43 confer two different bone phenotypes in zebrafish[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(24): 12601–12611.
- [31] Buo AM, Tomlinson RE, Eidelman ER, et al. Connexin 43 and Runx2 interact to affect cortical bone geometry, skeletal development, and osteoblast and osteoclast function[J]. *J Bone Miner Res*, 2017, 32(8): 1727–1738.
- [32] Talbot J, Brion R, Lamora A, et al. Connexin 43 intercellular communication drives the early differentiation of human bone marrow stromal cells into osteoblasts[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(2): 946–957.
- [33] Li S, Zhang H, Li S, et al. Connexin 43 and ERK regulate tension-induced signal transduction in human periodontal ligament fibroblasts[J]. *J Orthop Res*, 2015, 33(7): 1008–1014.
- [34] Tu B, Liu S, Liu G, et al. Inhibition of connexin 43 prevents trauma-induced heterotopic ossification[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37184.
- [35] Yang H, Shi L, Shi G, et al. Connexin 43 affects osteogenic differentiation of the posterior longitudinal ligament cells via regulation of ERK activity by stabilizing Runx2 in ossification[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(1): 237–247.
- [36] Bi Y, Wang G, Liu X, et al. Low-after-high glucose down-regulated Cx43 in H9c2 cells by autophagy activation via cross-regulation by the PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK1/2 signal pathways[J]. *Endocrine*, 2017, 56(2): 336–345.
- [37] Bellafiore M, Sivverini G, Palumbo D, et al. Increased Cx43 and angiogenesis in exercised mouse hearts[J]. *Int J Sports Med*, 2007, 28(9): 749–755.
- [38] Gärtner C, Ziegelhöffner B, Kostelka M, et al. Knock-down of endothelial connexins impairs angiogenesis[J]. *Pharmacol Res*, 2012, 65(3): 347–357.
- [39] Walker DL, Vacha SJ, Kirby ML, et al. Connexin 43 deficiency causes dysregulation of coronary vasculogenesis[J]. *Dev Biol*, 2005, 284(2): 479–498.
- [40] Krüger O, Maxeiner S, Kim JS, et al. Cardiac morphogenetic defects and conduction abnormalities in mice homozygously deficient for connexin 40 and heterozygously deficient for connexin 45[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 41(5): 787–797.
- [41] Guillotin B, Bourget C, Remy-Zoligadri M, et al. Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2004, 14(4–6): 325–332.
- [42] Grellier M, Ferreira-Tojais N, Bourget C, et al. Role of vascular endothelial growth factor in the communication between human osteoprogenitors and endothelial cells[J]. *J Cell Biochem*, 2009, 106(3): 390–398.
- [43] Villars F, Guillotin B, Amédée T, et al. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 282(4): C775–C785.
- [44] Guillotin B, Bareille R, Bourget C, et al. Interaction between human umbilical vein endothelial cells and human osteoprogenitors triggers pleiotropic effect that may support osteoblastic function[J]. *Bone*, 2008, 42(6): 1080–1091.
- [45] Herzog DP, Dohle E, Bischoff I, et al. Cell communication in a coculture system consisting of outgrowth endothelial cells and primary osteoblasts[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 320123.
- [46] Srinivasan S, Gross TS, Bain SD. Bone mechanotransduction may require augmentation in order to strengthen the senescent skeleton[J]. *Ageing Res Rev*, 2012, 11(3): 353–360.
- [47] Jiang JX, Siller-Jackson AJ, Burra S. Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress[J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 1450–1462.
- [48] Xia X, Batra N, Shi Q, et al. Prostaglandin promotion of osteocyte gap junction function through transcriptional regulation of connexin 43 by glycogen synthase kinase 3/beta-catenin signaling[J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(1): 206–219.
- [49] Dekel S, Lenthall G, Francis MJ. Release of prostaglandins from bone and muscle after tibial fracture. An experimental study in rabbits[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1981, 63-B(2): 185–189.
- [50] Keller J, Klammer A, Bak B, et al. Effect of local prostaglandin E2 on fracture callus in rabbits[J]. *Acta Orthop Scand*, 1992, 63(6): 623–627.
- [51] Zhang Y, Daaka Y. PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA/Ca²⁺ pathway[J]. *Blood*, 2011, 118(19): 5355–5364.
- [52] Gao FH, Wang Q, Wu YL, et al. c-Jun N-terminal kinase mediates AML1-ETO protein-induced connexin-43 expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356(2): 505–511.
- [53] Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, et al. Plasma membrane channels formed by connexins; their regulation and functions[J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(4): 1359–1400.
- [54] Gao J, Cheng TS, Qin A, et al. Glucocorticoid impairs cell-cell communication by autophagy-mediated degradation of connexin 43 in osteocytes[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19): 26966–26978.
- [55] Shen C, Kim MR, Noh JM, et al. Glucocorticoid suppresses connexin 43 expression by inhibiting the Akt/mTOR signaling pathway in osteoblasts[J]. *Calcif Tissue Int*, 2016, 99(1): 88–97.
- [56] Leis H, Page A, Ramírez A, et al. Glucocorticoid receptor counteracts tumorigenic activity of Akt in skin through interference with the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway[J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18(2): 303–311.
- [57] Wang X, Hu J, Price SR. Inhibition of PI3-kinase signaling by glucocorticoids results in increased branched-chain amino acid degradation in renal epithelial cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292(5): C1874–C1879.
- [58] Hu J, Mao Z, He S, et al. Icaritin protects against glucocorticoid induced osteoporosis, increases the expression of the bone enhancer DEC1 and modulates the PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin integrated signaling pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 136: 109–121.
- [59] Batra N, Riquelme MA, Burra S, et al. Direct regulation of osteocytic connexin 43 hemichannels through Akt kinase activated by mechanical stimulation[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(15): 10582–10591.

(责任编辑:唐秋姗)