

NOX2在骨稳态中的作用及其防治骨病的应用价值

田宝凯¹, 李梦煊², 常波³, 衣雪洁^{1,4*}

(1 沈阳体育学院运动健康学院, 沈阳 110102; 2 辽宁师范大学体育学院, 大连 116029; 3 珠海科技学院体育科学学院, 珠海 519000; 4 沈阳体育学院体育社会科学研究中心, 沈阳 110102)

摘要: NADPH氧化酶2(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2, NOX2)作为活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生的主要来源之一, 在骨骼系统生理病理过程中发挥关键作用。本文综述了NOX2在骨骼稳态维持与骨相关疾病中的研究进展。在生理状态下, NOX2通过精确调控ROS水平, 参与成骨细胞(osteoblast, OB)和破骨细胞(osteoclast, OC)活化, 维持骨重塑平衡。在病理状态下, NOX2功能失调与多种骨骼疾病密切相关, 包括骨关节炎(osteoarthritis, OA)、骨质疏松症(osteoporosis, OP)及骨肉瘤(osteosarcoma, OS)。尽管NOX2相关研究取得显著进展, 但NOX2在骨骼系统中的精确分子机制、与其他NOX家族成员的相互作用以及临床转化应用仍需深入探索。未来研究应聚焦于NOX2调控骨代谢的精确机制解析、特异性靶向药物开发及临床转化研究, 为骨相关疾病的防治提供新的理论基础和潜在靶点。

关键词: NOX2; 骨稳态; 成骨细胞; 破骨细胞; 骨病

中图分类号: {Q28}; Q441; R68 **文献标识码:** A

Role of NOX2 in bone homeostasis and its application against bone diseases

TIAN Bao-Kai¹, LI Meng-Huan², CHANG Bo³, YI Xue-Jie^{1, 4*}

(1 College of Exercise and Health, Shenyang Sport University, Shenyang 110102, China; 2 School of Physical Education, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China; 3 School of Sports Science, Zhuhai College of Science and Technology, Zhuhai 519000, China; 4 Exercise and Health Research Center/Department of Kinesiology, Shenyang Sport University, Shenyang 110102, China)

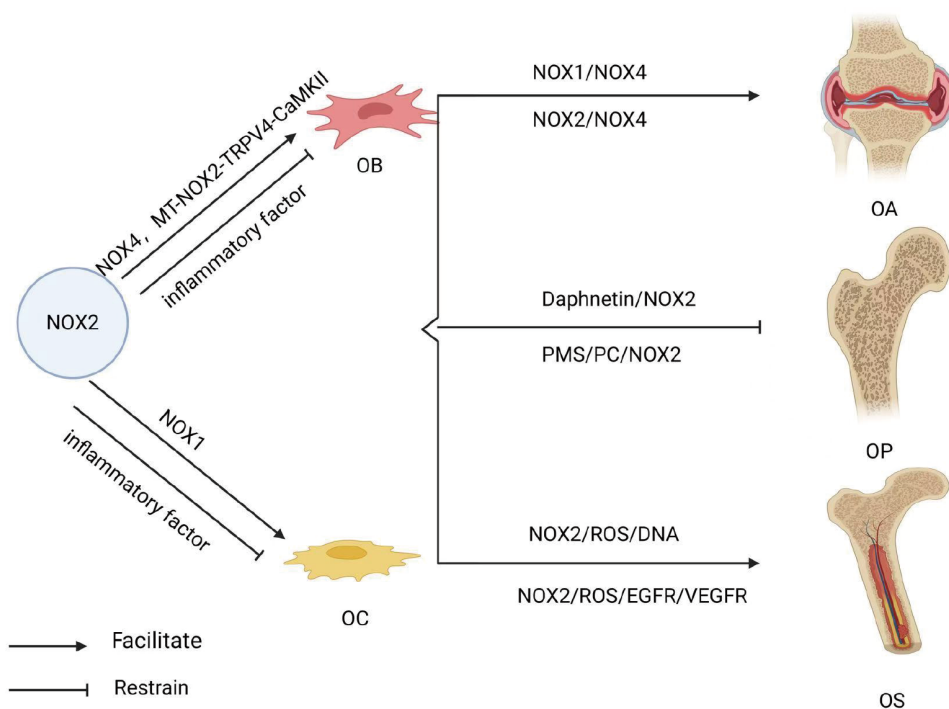
Abstract: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2 (NOX2) is a key enzymatic source of reactive oxygen species (ROS) in bone tissue, and the ROS it generates serve as crucial signaling molecules that precisely regulate bone metabolism. However, the molecular mechanisms of NOX2 in skeletal physiological and pathological processes, its spatiotemporal regulatory networks, and interactions with other NOX subtypes remain incompletely elucidated. This review aims to integrate existing research advances, delve into the core mechanisms of NOX2 in maintaining bone homeostasis and in bone-related diseases, identify current research gaps, and provide targeted recommendations for future research directions and clinical translation strategies to advance the development of NOX2-targeted diagnostic and therapeutic technologies. Under physiological conditions, NOX2 maintains dynamic equilibrium in bone metabolism by precisely regulating the activation, differentiation, and functional activities of osteoblasts (OB) and osteoclasts (OC). Notably, NOX2 exhibits significant age-dependent regulation of bone formation: juvenile NOX2 deficiency promotes osteoblast differentiation and bone formation through compensatory upregulation of NOX4, whereas chronic NOX2 deficiency in the elderly accelerates osteoblast senescence, enhances inflammatory responses in the bone microenvironment, and ultimately inhibits bone formation. Furthermore, the MT-NOX2-TRPV4-CaMKII signaling pathway mediates mechanically stimulated osteogenesis, revealing NOX2's crucial role in force sensing. For osteoclasts, physiological NOX2 knockout is functionally compensated by NOX1, causing minimal impact on bone resorption. However, under pathological conditions such as obesity, NOX2 deficiency increases inflammatory cytokine expression, significantly inhibiting osteoclast differentiation and bone resorption. Pathologically, NOX2 dysregulation is closely

收稿日期: 2025-07-18; 修回日期: 2025-09-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(12072202)

*通信作者: E-mail: Yixuejie8387@163.com

associated with multiple bone disorders. In osteoarthritis (OA), abnormal NOX2 activation promotes chondrocyte injury and extracellular matrix degradation. Different OA models exhibit subtype-specific mechanisms: Collagenase-induced OA (CiOA) relies on synovial macrophages to drive inflammation, where NOX2 deficiency can be compensated by NOX1/4; Whereas in the medial meniscus instability (DMM) model, synergistic NOX2/4 activity in chondrocytes and synovial cells promotes pathological progression. In osteoporosis (OP), NOX2 dysfunction disrupts the balance between bone formation and resorption, leading to bone mass loss; Under aging and diabetic conditions, daphnetin and PMS/PC improve bone mass and microarchitecture by suppressing NOX2 expression. In osteosarcoma (OS), NOX2-ROS drives malignant progression through dual mechanisms: Directly inducing DNA damage and impairing repair capacity to promote genomic instability and malignant proliferation; And activating EGFR and VEGFR signaling pathways to enhance cell invasion and angiogenesis while contributing to chemotherapy resistance development. Despite significant advances in NOX2 research, key scientific questions remain unresolved, including the precise molecular regulatory mechanisms of NOX2 in bone cells, synergistic/antagonistic interactions with other NOX subtypes, threshold definition for ROS concentration-dependent effects, and bottlenecks in translating basic research to clinical applications. Future research should focus on: (1) Utilizing single-cell sequencing and gene editing technologies to precisely decipher context-dependent regulatory networks of NOX2 in bone cell subpopulations; (2) Developing highly specific NOX2-targeted drugs to avoid off-target effects; (3) Conducting rigorously designed clinical trials targeting diseases such as OA, OP, and OS; (4) Exploring the diagnostic value of NOX2 as a biomarker for bone metabolic disorders. Through multidisciplinary integration, advancing the clinical translation of NOX2-targeting strategies will provide novel approaches for precision diagnosis and treatment of bone-related diseases.



Key words: NOX2; bone homeostasis; osteoblasts; osteoclasts; osteopathy

骨骼系统作为机体的重要支撑结构,其稳态维持依赖于骨形成与骨吸收的动态平衡。这一精密平衡对骨骼发育、机械力适应及损伤修复至关重要^[1,2]。随着全球人口老龄化加剧,骨关节炎(osteoarthritis, OA)、骨质疏松症(osteoporosis, OP)及骨肉瘤(osteosarcoma, OS)等骨稳态失衡相关疾病的发病率显著上升,已成为重大公共卫生挑战^[3-5]。因此,深入揭示骨稳态的分子调控机制对开发骨代谢疾病的新

型防治策略具有重要意义(图1)。

近年来,ROS作为关键信号分子,在骨代谢调控中的作用日益受到关注^[6]。研究表明,适量ROS对维持骨细胞正常功能必不可少,而ROS水平的过度升高或降低均可导致骨代谢紊乱^[7,8]。在多种ROS生成系统中,NADPH氧化酶(NOX)家族因其特异性催化ROS产生的功能成为研究热点^[9]。该家族包含七个成员(NOX1~5和DUOX1~2),其中NOX2(又

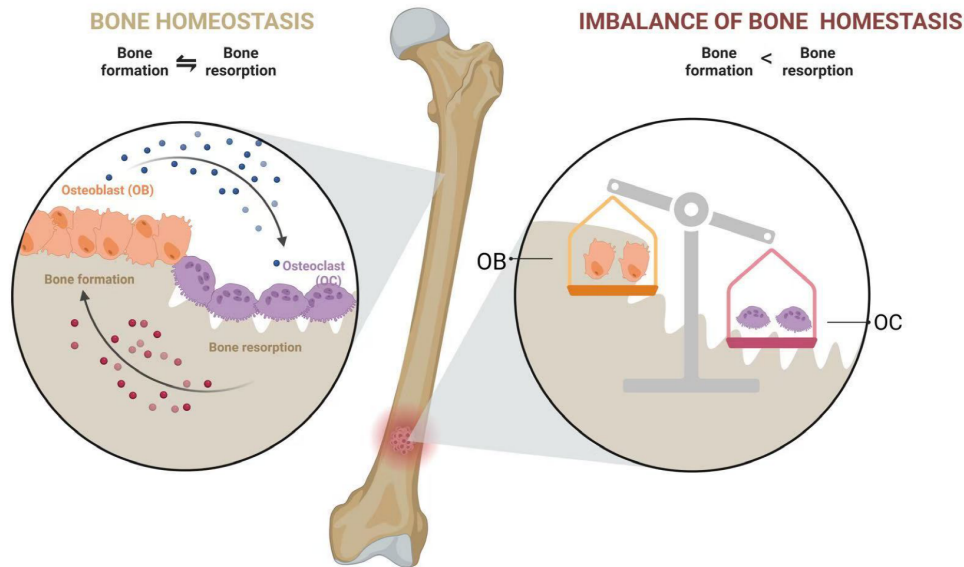


图1 骨稳态的维持机制

注:骨骼系统作为机体的重要支撑结构,其稳态维持依赖于OB介导的骨形成与OC调控的骨吸收,一旦两者动态平衡失调,则会导致骨相关疾病,例如OA、OP和OS等。成骨细胞(osteoblast, OB);破骨细胞(osteoclast, OC);骨关节炎(osteoarthritis, OA);骨质疏松症(osteoporosis, OP);骨肉瘤(osteosarcoma, OS)。

Figure 1 Mechanisms for maintaining bone homeostasis

Note: As the body's vital support structure, the skeletal system maintains homeostasis through OB-mediated bone formation and OC-regulated bone resorption. Disruption of this dynamic equilibrium leads to bone-related disorders such as OA, OP, and OS. Osteoblast, OB; osteoclast, OC; osteoarthritis, OA; osteoporosis, OP; osteosarcoma, OS.

称gp91phox)最早被发现并广泛研究^[10]。传统上, NOX2主要与吞噬细胞的杀菌功能相关,其遗传缺陷可导致慢性肉芽肿病^[11]。然而,近年来研究揭示,NOX2在成骨细胞(osteoblast, OB)和破骨细胞(osteoclast, OC)中均有表达,并参与调控这些细胞的分化、增殖和其他功能^[12,13]。

在骨代谢中,NOX2介导的ROS产生呈现出复杂的双向调节特性。一方面,低水平的NOX2产生适量ROS,可促进OB分化和骨形成;另一方面,过度活化的NOX2产生大量ROS,抑制成骨过程并促进OC活化^[12,13]。这种精细调控的失衡与OA、OP、OS等多种骨骼疾病密切相关^[14-16]。值得注意的是,NOX2通过调控软骨细胞与滑膜细胞的活性氧生成及炎症反应,成为疾病进展的核心驱动因素;而其对OB和OC的影响,多为上述核心作用引发的继发性效应。尽管NOX2相关研究取得显著进展,但NOX2在骨代谢中的精确作用机制仍存在争议,尤其是其与其他NOX家族成员的功能冗余、在不同骨细胞中的特异性作用以及在不同病理条件下的调控模式等问题尚未完全阐明。此外,靶向NOX2的干预策略在从实

验室研究向临床应用转化过程中仍面临诸多挑战。

因此,本综述旨在系统梳理NOX2在骨骼系统生理与病理过程中的研究进展,重点分析NOX2调控OB和OC功能的分子机制,探讨NOX2在OA、OP和OS中的病理作用,并展望NOX2作为骨代谢疾病防治靶点的转化前景,为骨稳态调控研究提供新视角。

1 NOX2的结构与功能概述

从分子结构看,NOX2是一个多亚基复合物,由膜结合组分和胞质调节组分共同构成^[17]。膜结合部分包括催化亚基gp91phox(即NOX2)和稳定性亚基p22phox,两者形成异二聚体,作为酶的核心^[18]。催化亚基含有六个跨膜结构域、两个血红素分子以及黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)和NADPH结合位点,构成了完整的电子传递链^[19]。胞质调节部分则包括p47phox、p67phox、p40phox和小G蛋白Rac,这些组分在细胞受到刺激时协同转位至膜,与膜结合组分相互作用形成具有活性的完整酶复合物^[20]。NOX2的活化过程高度

有序且受到精密调控。在静息状态下,膜组分和胞质组分分离存在,酶处于非活化状态,且p40phox帮助保持复合物处于此状态。当细胞接受刺激后,p47phox发生磷酸化并解除自抑制状态,促使整个胞质复合物向膜转位;同时Rac从GDP结合状态转变为GTP结合状态并独立转位至膜;随后p67phox与催化亚基相互作用,启动电子从NADPH通过FAD和血红素传递给氧分子的过程,最终产生超氧阴离子^[10,21-24]。这种精密的调控机制确保了ROS产生的时空特异性,使其能够作为信号分子参与生理过程而不会造成过度氧化损伤(图2)。

在生理功能方面,NOX2通过产生ROS作为关键信号分子,调控细胞增殖、分化、迁移和代谢等过程^[25]。ROS通过氧化修饰靶蛋白调节多条信号通路,这一机制在骨组织中尤为重要:适度水平的ROS既能促进OB分化,又可调节OC活性^[12,13]。值得注意的是,NOX2的功能呈现显著的剂量依赖性(表达量过高或过低易破坏氧化还原平衡),NOX2的活性状态对其功能具有重要调控作用——即使在正常剂量范围内,若NOX2活性出现异常升高或降低,仍会干扰氧化还原稳态,最终共同引发OA、OP及OS等骨代谢异常^[14-16]。因此,精确调控NOX2活性是骨疾病治疗研究的重要方向,其结构与功能特征为解析骨稳态调控机制提供了分子基础,相关调控网络

的具体作用将在后续章节深入阐述。

2 NOX2对骨稳态的调控

骨稳态的维持依赖于OB介导的骨形成与OC介导的骨吸收之间的精密平衡^[26]。近年来研究发现,NOX2作为ROS的关键来源,在这一动态平衡调控网络中扮演着双重角色:一方面通过影响OB分化与功能调控骨形成过程,另一方面参与OC活化与骨吸收的精确调节^[27,28]。值得注意的是,NOX2对骨代谢的调控表现出显著的年龄依赖性和环境敏感性,其作用机制涉及机械应力响应、氧化还原信号传导及炎症微环境调控等多重途径^[29-35]。下面将阐述NOX2在OB与OC功能调控中的分子机制,揭示其在骨稳态维持中的关键地位与潜在应用价值。

2.1 NOX2对OB的影响

p47phox是NOX2活化所必需的关键调节亚基,其敲除导致NOX2功能性失活,从而有效模拟NOX2缺失状态。年轻期(6周龄)小鼠NOX2 p47phox亚基基因敲除(p47phox^{-/-})呈现出显著的骨量增加表型^[29],包括皮质骨密度显著升高,虽然骨小梁密度变化不明显,但整体骨矿物质含量有显著增加。力学测试结果显示,骨组织刚度和承重能力(峰值载荷)均有明显提高^[29]。血生化指标骨形成标志物骨钙素(osteocalcin, OCN)和碱性磷酸酶(alkaline

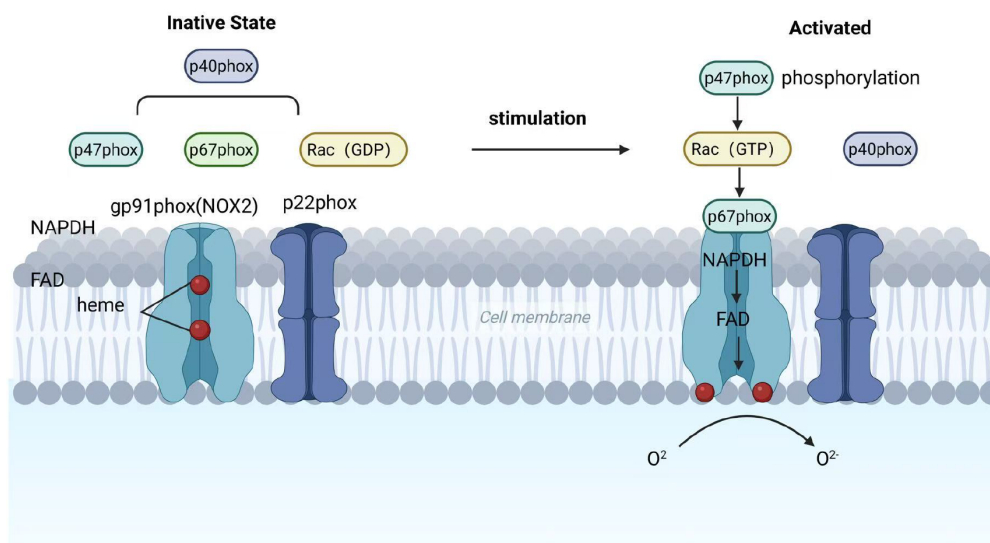


图2 NOX2的活化过程

静息状态: Inactive State; 激活状态: Activated; 黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD); 血红素分子:heme。

Figure 2 Activation process of NOX2

Inactive State; Activated State; Flavin Adenine Dinucleotide (FAD); Heme Molecule.

phosphatase, ALP)水平显著上升,表明OB活性增强。这些发现共同表明,在生长发育期,NOX2功能缺失促进了OB介导的骨形成过程,最终导致骨量增加和骨强度提高^[29]。然而,在老年阶段(2岁龄),p47phox^{-/-}小鼠却表现出与年轻期完全相反的骨表型^[29]。这些老年敲除小鼠的骨组织中炎症水平显著增加,多种促炎细胞因子表达上调,如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)及核因子κB受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor-κB ligand, RANKL);同时,衰老相关标志物如SA-β-半乳糖苷酶(SA-β-Gal)活性以及细胞周期抑制因子p16和p53的表达也明显升高^[29]。体外实验进一步证实了这一年龄依赖性效应。从老年p47phox^{-/-}小鼠颅骨分离的OB显示增殖能力下降、分化潜能减弱,且衰老和炎症相关基因表达水平显著增强。这些结果表明,NOX2功能的长期缺失可能导致骨微环境紊乱,加速OB衰老进程,最终引起骨量减少和骨强度下降。这种显著的年龄依赖性调控现象的具体分子机制尚未完全阐明。一种可能的解释是,幼年时期NOX4存在代偿性上调以维持成骨功能,但随年龄增长这一机制逐渐失效,长期氧化还原失衡引发骨组织炎症和功能障碍^[29]。

除年龄依赖性影响外,NOX2还在机械刺激诱导的骨形成过程中扮演关键角色。OB能够感知机械刺激并将其转化为生化信号,这一被称为机械转导的过程在骨重塑中至关重要^[30]。近期研究揭示了一条以NOX2为核心的机械力信号转导通路。Lyons等^[31]发现,流体剪切应力(fluid shear stress, FSS)通过微管(microtubule, MT)网络触发NOX2介导的氧化应激反应,进而调控骨形成。当OB和骨细胞系(如Ocy454细胞)暴露于FSS环境时,细胞内微管结构发生去酪氨酸化修饰(一种降低微管稳定性的翻译后修饰),这一变化显著增强了微管网络对机械力的敏感性^[31]。修饰后的微管结构能够高效激活NOX2复合物,促进ROS生成。这些NOX2来源的ROS随后通过氧化修饰作用于瞬时受体电位香草酸亚型4离子通道(transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4),触发钙离子(Ca²⁺)内流^[31,32]。Ca²⁺内流进一步激活钙调蛋白依赖性蛋白激酶II(CaMKII),后者通过降低骨硬化蛋白(sclerostin)的表达水平,解除了对OB分化和骨形成的抑制作用^[33]。值得注

意的是,NOX2特异性抑制剂或抗氧化剂处理可完全阻断FSS诱导的钙信号级联,证实NOX2-ROS轴是机械力转导的核心环节^[31]。总体而言,这一MT-NOX2-TRPV4-CaMKII信号级联反应构成了机械刺激转化为骨形成信号的核心通路,揭示了NOX2作为机械力感应器和信号放大器的重要功能。与前述年龄依赖性调控不同,这一机制在骨细胞对即时机械刺激的响应中发挥作用,体现了NOX2在骨代谢动态调控中的多维功能。

综上所述,NOX2对OB的影响呈现复杂的双面性:在幼年期,其功能缺失可能通过NOX4代偿性上调等机制促进OB分化和骨形成;在老年期,长期的NOX2功能缺失则加速OB衰老、增强骨组织微环境炎症反应,最终抑制骨形成;同时,NOX2作为机械应力感知和转导的关键分子,参与机械刺激诱导的骨形成。未来研究可聚焦于揭示NOX2调控的年龄特异性机制、NOX家族成员间的代偿网络、炎症微环境与细胞衰老的分子关联以及机械应力响应信号通路的精细调控,从而更全面地阐明NOX2在骨稳态维持中的关键作用。

2.2 NOX2对OC的影响

OC是骨重塑过程中负责骨吸收的特化细胞,源自造血干细胞衍生的单核-巨噬细胞系^[36]。研究表明,NOX2在OC的发育和功能中发挥复杂作用,其效应取决于实验条件和生理状态。

关于NOX2对OC分化的影响,现有研究结果存在一定差异。Sasaki等^[34]发现,在基础生理条件下,转染了NOX2小干扰RNA(siRNA)的骨髓来源巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMM)在RANKL和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)刺激下仍能正常分化为抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)阳性多核OC,且分化效率与野生型(WT)小鼠相当。这提示NOX2并非OC基础分化所必需。例如,在基础状态下,RANKL刺激BMM细胞向OC分化的过程中,NOX2基因及其调节亚基p47phox的mRNA水平均明显降低,而NOX1和NOX4基因的mRNA水平显著上调。在NOX1基因敲除小鼠的BMM细胞中,RANKL诱导的NOX4 mRNA表达进一步增强,这种表达模式转换暗示着氧化酶系统从以NOX2为主向NOX1/NOX4为主的转变,可能反映了不同NOX家族成员在OC分化不同阶段的特异性作用,NOX家族

成员之间存在功能互补性^[34]。并且,通过使用特异性siRNA靶向不同NOX家族成员的实验揭示,在WT小鼠BMM中,单独敲低NOX1或NOX2表达均不足以显著抑制RANKL诱导的ROS产生和OC形成^[34]。然而,在NOX2敲除小鼠的BMM中,NOX1 siRNA可显著抑制ROS产生和OC分化;相应地,在NOX1敲除小鼠的BMM中,NOX2 siRNA也能发挥类似抑制作用^[34]。更重要的是,敲低两者共同依赖的膜亚基p22phox,无论在WT还是NOX1缺失BMM中,均能显著抑制ROS产生和OC形成。这些结果表明,NOX1和NOX2在OC分化过程中具有冗余和互补作用,共同维持ROS依赖的信号转导,从而保证正常的分化进程^[34]。这种补偿机制可能解释了为何单独敲除NOX2对基础OC分化影响有限。

相较之下,在病理状态下NOX2作用更为突出。高脂饮食(high-fat diet, HFD)诱导WT小鼠骨髓微环境中OC数量显著增加,而NOX2基因敲除(NOX2-KO)小鼠中这种增加效应明显减弱^[35]。同样,在RAW264.7细胞中沉默NOX2可降低ROS水平并抑制OC分化^[35]。这些结果表明,NOX2在病理状态或应激条件下对OC分化的影响更为突出。例如,在肥胖状态下,NOX2活性增强导致ROS生成增加,并进一步促进炎症因子如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的表达^[37,38]。TNF- α 和IL-6等炎症因子在OC分化过程中发挥重要作用^[39,40]。研究表明,在WT小鼠中,HFD可诱导骨髓微环境中TNF- α 、IL-6等炎症因子的表达显著升高,同时OC数量增加;而在NOX2-KO小鼠中,HFD诱导的炎症因子表达升高幅度明显减小,OC的生成也相应减少^[35]。这说明NOX2通过调控炎症因子的表达,间接影响OC的分化和功能,但其具体信号通路仍需进一步研究。

综合来看,NOX2对OC的影响呈现环境依赖性特征。在正常生理状态下,由于NOX家族成员间的功能互补,NOX2敲除对OC分化和骨吸收功能影响较小;而在肥胖等病理条件下,NOX2敲除则显著抑制OC的分化和骨吸收功能,表明NOX2在病理状态下的作用更为突出。

3 NOX2调控骨疾病的相关机制

NOX2作为ROS的重要来源,在多种骨疾病的病理进程中发挥关键作用。研究表明,NOX2通过

调控氧化应激水平、炎症反应及细胞代谢等过程,参与OA、OP和OS的发生发展。在不同骨疾病中,NOX2的表达和功能呈现显著差异:在OA和OP中,NOX2的过度活化加剧组织退变和骨量丢失;而在OS中,NOX2的高表达则促进肿瘤细胞的增殖和存活。下面将系统阐述NOX2在三大骨疾病中的分子机制,为靶向NOX2的治疗策略提供理论依据。

3.1 骨关节炎

OA是一种以关节软骨退行性变、滑膜炎症和异位骨形成为主要病理特征的慢性关节疾病,其发病机制复杂,涉及年龄、肥胖、机械应力及炎症微环境等多种因素^[41]。在OA进展过程中,软骨细胞外基质降解(如MMP-13、Adamts5表达上调)、软骨细胞凋亡及坏死,以及炎症因子和损伤相关分子模式(DAMPs)的释放,是驱动疾病的主导因素。这些信号会继发性激活软骨下骨OC活性,导致骨重塑异常,同时伴随滑膜炎症放大和氧化应激水平升高,最终共同导致关节结构破坏和功能障碍^[42]。

临床研究发现,NOX2在OA中的作用主要表现为调控软骨细胞和滑膜细胞的ROS生成和炎症反应。膝关节OA(knee osteoarthritis, KOA)患者的滑膜和软骨细胞中NOX2蛋白含量相较于对照组显著增加,NALP3炎性小体(NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 Inflammasome)表达增加,且与疾病严重程度(Kellgren-Lawrence分级)呈正相关^[15,43]。在动物模型中,这一现象亦得到证实:胶原酶诱导OA(collagenase-induced osteoarthritis, CiOA)模型小鼠滑膜组织中NOX2亚基基因表达随病程进展上调^[44];Kruisbergen等^[45]在WT和NOX2基因敲除(NOX2^{-/-})小鼠中建立CiOA模型,并同时给予西方饮食(Western Diet, WD)干预——这是一种起源于工业化西方国家的现代膳食模式,其核心特征为高精度碳水化合物(如精制谷物、高果糖玉米糖浆)、高饱和脂肪(如黄油、高脂乳制品)、高加工肉类(如香肠、培根)及高糖饮料摄入,同时显著缺乏全谷物、新鲜果蔬、鱼类及坚果等富含膳食纤维与不饱和脂肪酸的食物。该饮食模式因能量密度高、营养结构失衡,已被大量研究证实可诱导肥胖、胰岛素抵抗及慢性低度炎症等代谢紊乱状态,因此本研究选用WD模拟临床中与肥胖相关的骨关节炎病理背景^[46-48]。结果显示,在西方饮食干预下,NOX2^{-/-}小鼠的软骨损伤程度显著低于WT小

鼠,表明NOX2在代谢紊乱背景下的CiOA病理进程中发挥关键作用。此外,Han等^[49]在通过内侧半月板不稳定(destabilization of the medial meniscus, DMM)手术诱导OA的小鼠组织以及在IL-1 β 刺激的原代软骨细胞中观察到NOX2表达与ROS水平同步升高,且二者呈显著正相关,进一步强调了NOX2介导的氧化应激在OA中的作用。

NOX2通过多重机制调控OA的发生发展。在CiOA小鼠,滑膜组织的NOX2亚基(Cyba、Cybb、Ncf1、Ncf2、Ncf4)基因表达在诱导后第7天显著上调,且与滑膜炎程度正相关^[44]。关节内注射相关炎症刺激因素S100钙结合蛋白A8/A9复合物(S100 calcium-binding protein A8/A9 complex, S100A8/A9)可显著升高滑膜Ncf1表达,提示其可能通过激活NOX2关键调节亚基Ncf1驱动ROS生成^[44]。Ncf1基因编码的p47phox蛋白是NOX2复合物组装和激活的关键分子,其缺失会导致NOX2复合物无法正常组装,从而显著减少巨噬细胞和中性粒细胞中由NOX2介导的ROS生成。在CiOA小鼠中,研究者通过构建Ncf1基因敲除小鼠实现了NOX2的功能性缺失。结果发现,Ncf1缺陷小鼠在CiOA中,无论是早期(第7天)还是晚期(第42天),其软骨损伤(基于改良OARSI评分)、滑膜增厚、S100A8/A9蛋白水平、炎症细胞(巨噬细胞、中性粒细胞、单核细胞)比例均与WT小鼠无显著差异,血清炎症因子(IL-1 β 、KC、MCP-1等)水平亦未受影响,但NOX2的缺失整体减轻了滑膜炎^[44]。为解释这一看似矛盾的结果,深入研究发现,Ncf1缺陷小鼠的多形核中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMNs)因NOX2失活,完全丧失了PMA/S100A8诱导的ROS生成能力,而BMM则可通过激活NOX1等补偿机制维持ROS产生,其NOX1基因表达水平较WT小鼠明显升高,表明巨噬细胞能够通过非NOX2途径补偿中性粒细胞的功能缺失。这种代偿机制可能在病程全程发挥作用,使得无论是早期还是晚期病变,Ncf1缺陷小鼠与WT小鼠的各项指标均无显著差异。由此可见,NOX2介导的ROS生成在OA病程中的作用可能因存在代偿机制而较为复杂,其作为OA治疗靶点的潜力仍需进一步研究探索^[44]。

此外,在DMM手术诱导OA的小鼠组织以及在IL-1 β 刺激(模拟OA炎症微环境)的原代软骨细胞中,IL-1 β 刺激显著上调软骨细胞NOX2和NOX4的

mRNA表达,并通过激活Ras相关的C3肉毒素底物1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1)/p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)/c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路,促进基质金属蛋白酶13(matrix metalloproteinase 13, MMP-13)和Adamts5的mRNA水平升高,诱导氧化应激标志物Fth1、Hmox1和8-OHdG阳性细胞增加^[49]。NOX2抑制剂APX-115 free base(APX-115)预处理可显著抑制IL-1 β 诱导的MMP-13/Adamts5蛋白表达,并恢复II型胶原(Col2)和聚集蛋白聚糖(aggrecan)的合成,且APX-115治疗8周后可使软骨损伤的OARSI评分降低,骨赘形成减少,以及MMP-13和8-OHdG阳性细胞比例下降^[49]。上述研究提示NOX2可通过Rac1/p38MAPK/JNK信号通路促进MMP-13和Adamts5表达并诱导氧化应激,进而参与OA进展,而NOX2抑制剂APX-115可通过抑制该过程缓解软骨损伤。

值得注意的是,在OA病程中,NOX2对OB和OC的影响主要是继发性结果,其病理作用的核心在于软骨细胞和滑膜细胞的ROS生成及炎症调控。两项研究结果的差异源于模型机制与细胞类型的特异性: CiOA模型依赖滑膜巨噬细胞驱动炎症,其NOX2缺失可被NOX1/4补偿,而DMM模型中软骨细胞和滑膜细胞的NOX2/4协同促进病理进程。综上,针对NOX2/4的联合靶向干预(如APX-115抑制NOX2的同时阻断NOX4信号)或比单一抑制更能规避补偿效应,成为OA治疗的潜在策略。

3.2 骨质疏松症

OP是一种以骨量减少和骨组织微结构破坏为特征的骨骼疾病,这种病理变化显著增加了骨质疏松性和骨折风险^[50]。近年来研究表明,NOX2介导的ROS是OP发生发展的关键病理机制,尤其在衰老和糖尿病等典型致病环境中发挥核心作用^[14,51]。

衰老是OP的主要危险因素之一。在衰老加速小鼠(SAMP8)模型中,随年龄增长,骨组织中NOX2表达显著上调,伴随ROS水平升高^[51]。显微CT分析显示,SAMP8小鼠出现典型的骨退行性改变,包括骨小梁数量减少、骨体积分数(BV/TV)降低、皮质骨变薄,进而导致骨弹性模量和极限载荷等力学性能显著下降^[51]。机制研究表明,NOX2生成的ROS可通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路,下调成骨关键

基因(如OCN、OPN)的mRNA表达,最终抑制OB分化^[51]。当对SAMP8小鼠进行体内干预时,通过腹腔注射瑞香素(daphnetin, 50 mg/kg·d,连续给药12周)抑制NOX2后,其骨组织氧化应激水平(8-OHdG)显著降低,OB活性和矿化结节形成能力恢复至接近同龄WT小鼠水平,同时骨体积比(BV/TV)和骨强度均显著改善^[51]。这提示NOX2是衰老相关OP中调控骨形成不足的核心分子。

此外,糖尿病通过持续高血糖和代谢紊乱加剧OP进展^[52]。以链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的1型糖尿病小鼠模型为例,其胫骨骨组织呈现骨小梁数量减少、骨密度(bone mineral density, BMD)降低、骨微结构破坏等典型OP特征。研究表明,高血糖和脂肪酸氧化可通过激活蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)通路,促使NOX2调节亚基p47phox磷酸化并转位至细胞膜,形成活性氧化酶复合物,导致ROS过度生成^[14]。NOX2介导的ROS在骨血管内皮细胞(尤其是H型血管)中发挥关键调控作用。H型血管作为骨组织中一种特殊的血管亚型,以高表达血小板内皮细胞黏附分子(cluster of differentiation 31, CD31)和内皮黏蛋白(endomucin, EMCN)为特征,主要分布于生长板和骨小梁周围,具有强效促进OB分化和骨形成的作用,是血管-骨偶联的重要结构基础^[53]。NOX2介导的ROS可通过氧化修饰血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的mRNA,并抑制血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)等旁分泌因子分泌,导致H型血管标志物CD31和EMCN表达减少,血管-骨偶联功能受损。当抑制NOX2后,血管生成-成骨偶联相关基因(Noggin、Fgf1、Pdgfa)的mRNA表达及H型血管数量(CD31/EMCN双染定量)均得以恢复^[14]。在糖尿病诱导的小鼠颅顶骨成骨前体细胞系(MC3T3-E1)中,苯硫醚介孔二氧化硅纳米颗粒/原花青素(PMS/PC)可通过下调NOX2蛋白表达,显著逆转高糖诱导的ALP活性降低和矿化结节形成减少等表型^[14]。综上,NOX2-ROS信号轴可能是糖尿病骨病中血管-骨偶联障碍的重要调控机制之一。

上述研究表明,无论是衰老还是糖尿病环境,NOX2均通过ROS依赖的信号通路抑制成骨、破坏血管-骨偶联,最终促进OP发生。靶向NOX2的干预

措施(如瑞香素、PMS/PC)已在动物模型中显示出改善骨量和骨微结构的效果,为OP治疗提供了新方向。然而,不同病理微环境下NOX2下游信号网络存在差异,其具体调控机制及跨模型的共性靶点仍需深入解析。未来研究需进一步明确NOX2在骨-血管交互作用中的时空表达特征,为开发精准靶向疗法提供理论依据。

3.3 骨肉瘤

OS是常见的恶性骨肿瘤,具有显著的局部浸润和转移倾向,但其发病机制尚未完全阐明^[54]。大量研究表明,OS细胞起源于成骨细胞谱系(osteoblastic lineage),包括骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)及其向成骨分化过程中的中间阶段细胞^[55]。在这一过程中,成骨相关转录因子(如Runx2、Osterix)的异常调控使细胞停留在不成熟的成骨样状态,并在关键基因突变(如p53、Rb)和信号通路异常(Wnt/ β -catenin、Notch)的驱动下发生恶性转化^[56]。因此,OS不仅保留了部分OB的分子和表型特征(如碱性磷酸酶活性和骨样基质形成能力),还展现出高度的基因组不稳定性 and 侵袭性,为其恶性进展奠定了细胞学基础^[57]。

在原发性OS组织中,NOX2的mRNA和蛋白水平均显著升高。临床样本分析表明,NOX2高表达与肿瘤大小和部位密切相关,尤其是在位于肱骨、骨盆等部位的大体积肿瘤中更为常见,并与患者不良预后呈正相关^[16]。功能研究显示,NOX2在OS细胞的增殖和存活中发挥关键作用。在体外实验中,研究人员采用广谱NADPH氧化酶抑制剂二苯基碘化铵(diphenyleneiodonium chloride, DPI)处理HOS、MG-63和HuO9N2等多种骨肉瘤细胞系时发现,随着DPI浓度增加,细胞活力呈现剂量依赖性下降,同时伴随细胞内ROS水平降低和细胞凋亡率显著升高。为特异性验证NOX2的作用,研究人员进一步通过RNA干扰技术沉默HOS和HuO9N2细胞中的NOX2表达,结果发现与对照组相比,NOX2基因沉默组的细胞增殖能力明显减弱,这一现象与DPI处理组观察到的效应高度一致。这些研究结果从药理学抑制和基因干预两个层面共同证实,NOX2通过调控细胞内ROS水平在维持骨肉瘤细胞存活和促进增殖过程中发挥着不可替代的作用,为深入理解OS的发病机制提供了新的分子视角^[58]。

NOX2调控OS发生发展的机制与其催化ROS

生成及多重信号交互密切相关。在 OS 细胞中, NOX2生成的ROS可直接对DNA发起氧化攻击。具体而言, ROS能够导致碱基修饰, 例如促使8-OHdG的生成, 同时还会引发 DNA双链断裂^[16]。这种DNA损伤会激活细胞内的DNA损伤应答通路, 其中ATM激酶通过磷酸化下游多种蛋白(如p53、Chk2、BRCA1等), 启动信号级联, 参与细胞周期检查点控制、凋亡反应和DNA修复等^[16]。值得注意的是, 在许多OS细胞中, p53基因常发生突变, 导致其编码的蛋白功能异常, 严重削弱DNA损伤修复能力^[16]。这使得细胞更易受NOX2-ROS损伤, 进而导致损伤的DNA在细胞内不断累积。随着时间的推移, 这种累积的DNA损伤会进一步驱动基因组的不稳定, 进而促使细胞发生恶性增殖, 推动OS的发生和发展^[16]。

除了对DNA的直接损伤作用外, NOX2生成的ROS还能够通过氧化修饰激活多种关键的信号通路, 形成NOX2-表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)-血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)之间的相互作用正反馈环路, 促进血管生成并加剧OS的恶性进展。在这一过程中, EGFR和VEGFR作为两个重要的受体酪氨酸激酶发挥核心作用。具体而言, ROS可诱导EGFR胞内结构域的半胱氨酸残基发生氧化, 增强EGFR的二聚化及酪氨酸磷酸化, 激活下游PI3K-AKT和RAS-MAPK信号通路, 促进OS细胞的增殖、存活和侵袭。同时, NOX2生成的ROS还能稳定缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α), 促进VEGFR的转录, 增加肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD), 为肿瘤提供更丰富的血液供应。研究证实, 在NOX2高表达的OS组织中, HIF-1 α 与VEGFR2呈共表达状态, 且VEGFR2的表达与MVD呈正相关, 进一步证实了这一促血管生成信号网络在OS发展中的重要性^[58-61]。

综上所述, NOX2在OS的发生发展中扮演着关键角色, 其通过催化ROS的生成, 一方面直接引起DNA损伤并削弱DNA修复能力, 驱动基因组不稳定和细胞恶性增殖; 另一方面激活EGFR和VEGFR等信号通路, 增强细胞侵袭能力和促进血管生成, 进而推动OS的恶性进展。这些研究结果为深入理解NOX2在OS中的作用机制提供了重要依据, 并为未来基于NOX2的OS诊断和治疗策略的开发奠定了理论基础。

4 小结与展望

本文系统综述了NOX2在骨骼系统生理与病理过程中的关键作用。NOX2作为ROS的主要来源之一, 在骨组织中表达广泛, 并参与调控多种骨细胞的功能。研究表明, NOX2通过精确调控ROS水平, 在骨形成、骨吸收和骨重塑的平衡中发挥复杂作用。在生理状态下, NOX2对OB增殖和成骨分化具有环境依赖性调控作用, 低水平ROS促进成骨分化, 而过量ROS则抑制这一过程。对于OC, NOX2与NOX1在分化过程中存在功能互补, 共同调控ROS依赖的细胞内信号传导。在病理状态下, NOX2功能的失调与多种骨骼疾病密切相关。在OA中, NOX2介导的ROS产生激活多条信号通路, 促进软骨细胞衰老和凋亡, 加剧软骨基质降解。在OP中, NOX2活性增强导致OB成骨分化受损, 同时促进OC分化, 加速骨量丢失。在OS中, NOX2高表达与肿瘤体积和不良预后相关, 抑制NOX2活性可有效抑制OS细胞增殖和存活。这些研究发现揭示了NOX2作为骨骼系统重要调控因子的多面性作用, 为理解骨骼相关疾病的发病机制提供了新视角。

但当前研究存在三大局限: NOX2在骨稳态中的精确分子机制尚未完全阐明; NOX2与其他NOX家族成员的功能重叠与代偿机制缺乏系统研究; 研究主要局限于细胞与动物模型, 缺乏大规模临床数据支持。未来研究应聚焦于: 深入解析NOX2在不同年龄段和病理状态下对骨代谢的动态调控机制; 探讨NOX2与其他NOX家族成员的相互作用网络; 开发特异性NOX2抑制剂并结合先进的药物递送系统, 探索其在骨修复和骨肿瘤治疗中的应用; 加强临床转化研究, 验证NOX2作为生物标志物和治疗靶点的临床价值; 阐明NOX2与炎症因子、血管生成及免疫反应的相互作用, 特别是在代谢性疾病背景下对骨代谢的影响。通过多学科交叉研究, 深入揭示NOX2在骨代谢中的调控网络, 将为骨相关疾病的防治提供新的理论依据和干预策略。

参考文献

- [1] Zhu Q, Fu Y, Cui CP, et al. OTUB1 promotes osteoblastic bone formation through stabilizing FGFR2. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8: 142.
- [2] Zheng J, Li X, Zhang F, et al. Targeting osteoblast-osteoclast cross-talk bone homeostasis repair microcarriers

- promotes intervertebral fusion in osteoporotic rats. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13: e2402117.
- [3] Belenska-Todorova L, Zhivkova R, Markova M, et al. Follicle stimulating hormone and estradiol alter immune response in osteoarthritic mice in an opposite manner. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2021, 35: 20587384211016198.
- [4] Yin J, Han L, Cong W. Alpinumisoflavone rescues glucocorticoid-induced apoptosis of osteocytes via suppressing Nox2-dependent ROS generation. *Pharmacol Rep*, 2018, 70: 270–6.
- [5] Pan Y, Chen D, Hu T, et al. Characteristics and prognostic factors of patients with osteosarcoma older than 60 years from the SEER database. *Cancer Control*, 2019, 26: 1073274819888893.
- [6] Ren X, Liu H, Wu X, et al. Reactive oxygen species (ROS)-responsive biomaterials for the treatment of bone-related diseases. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 820468.
- [7] Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells Dev*, 2015, 24: 1150–63.
- [8] Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21: 363–83.
- [9] Nazari B, Jaquet V, Krause KH. NOX family NADPH oxidases in mammals: Evolutionary conservation and isoform-defining sequences. *Redox Biol*, 2023, 66: 102851.
- [10] Nocella C, D'Amico A, Cammisotto V, et al. Structure, activation, and regulation of NOX2: At the crossroad between the innate immunity and oxidative stress-mediated pathologies. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12: 429.
- [11] Nauseef WM. The phagocyte NOX2 NADPH oxidase in microbial killing and cell signaling. *Curr Opin Immunol*, 2019, 60: 130–40.
- [12] Zhu C, Shen S, Zhang S, et al. Autophagy in bone remodeling: A regulator of oxidative stress. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 898634.
- [13] Liu M, Wu X, Cui Y, et al. Mitophagy and apoptosis mediated by ROS participate in AlCl₃-induced MC3T3-E1 cell dysfunction. *Food Chem Toxicol*, 2021, 155: 112388.
- [14] Hu XF, Xiang G, Wang TJ, et al. Impairment of type H vessels by NOX2-mediated endothelial oxidative stress: critical mechanisms and therapeutic targets for bone fragility in streptozotocin-induced type 1 diabetic mice. *Theranostics*, 2021, 11: 3796–812.
- [15] Clavijo-Cornejo D, Martínez-Flores K, Silva-Luna K, et al. The overexpression of NALP3 inflammasome in knee osteoarthritis is associated with synovial membrane prolidase and NADPH oxidase 2. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 1472567.
- [16] Lin RJ, Huang Z, Wang SL, et al. Clinicopathological and prognostic value of NADPH oxidase 2 (NOX2) in primary osteosarcoma. *J Orthop Sci*, 2021, 26: 466–72.
- [17] Noreng S, Ota N, Sun Y, et al. Structure of the core human NADPH oxidase NOX2. *Nat Commun*, 2022, 13: 6079.
- [18] Tlili A, Pintard C, Hurtado-Nedelec M, et al. ROCK2 interacts with p22phox to phosphorylate p47phox and to control NADPH oxidase activation in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120: e2209184120.
- [19] Breitenbach M, Rinnerthaler M, Weber M, et al. The defense and signaling role of NADPH oxidases in eukaryotic cells: Review. *Wien Med Wochenschr*, 2018, 168: 286–99.
- [20] Hoang HM, Johnson HE, Heo J. Rac-dependent feedforward autoactivation of NOX2 leads to oxidative burst. *J Biol Chem*, 2021, 297: 100982.
- [21] Mondal NK, Li S, Elsenousi AE, et al. NADPH oxidase overexpression and mitochondrial OxPhos impairment are more profound in human hearts donated after circulatory death than brain death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2024, 326: H548–62.
- [22] Takeya R, Ueno N, Kami K, et al. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem*, 2015, 290: 6003.
- [23] Belambri SA, Marzaioli V, Hurtado-Nedelec M, et al. Impaired p47phox phosphorylation in neutrophils from patients with p67phox-deficient chronic granulomatous disease. *Blood*, 2022, 139: 2512–22.
- [24] Lee CF, Carley RE, Butler CA, et al. Rac GTPase signaling in immune-mediated mechanisms of atherosclerosis. *Cells*, 2021, 10: 2808.
- [25] Wang Y, Liu XY, Wang Y, et al. NOX2 inhibition stabilizes vulnerable plaques by enhancing macrophage efferocytosis via MertK/PI3K/AKT pathway. *Redox Biol*, 2023, 64: 102763.
- [26] Hayman DJ, Johnson de Sousa Brito FM, Lin H, et al. microRNA-324 mediates bone homeostasis and the regulation of osteoblast and osteoclast differentiation and activity. *Bone*, 2025, 190: 117273.
- [27] Bai SC, Xu Q, Li H, et al. NADPH oxidase isoforms are involved in glucocorticoid-induced preosteoblast apoptosis. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:

- 9192413.
- [28] Ye W, Liao Y, Liu X, et al. Dectin-2 depletion alleviates osteoclast-induced bone loss in periodontitis via Syk/NOX2/ROS signaling. *Free Radic Biol Med*, 2025, 229: 13–29.
- [29] Chen JR, Lazarenko OP, Blackburn ML, et al. p47phox-Nox2-dependent ROS signaling inhibits early bone development in mice but protects against skeletal aging. *J Biol Chem*, 2015, 290: 14692–704.
- [30] Williams KM, Leser JM, Gould NR, et al. TRPV4 calcium influx controls sclerostin protein loss independent of purinergic calcium oscillations. *Bone*, 2020, 136: 115356.
- [31] Lyons JS, Joca HC, Law RA, et al. Microtubules tune mechanotransduction through NOX2 and TRPV4 to decrease sclerostin abundance in osteocytes. *Sci Signal*, 2017, 10: eaan5748.
- [32] Gao M, Han J, Zhu Y, et al. Blocking endothelial TRPV4-Nox2 interaction helps reduce ROS production and inflammation, and improves vascular function in obese mice. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, 157: 66–76.
- [33] Xie Y, Bao Z, Wang Z, et al. Magnesium ascorbyl phosphate promotes bone formation via CaMKII signaling. *J Bone Miner Res*, 2023, 38: 1015–31.
- [34] Sasaki H, Yamamoto H, Tominaga K, et al. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-induced mouse osteoclast differentiation is associated with switching between NADPH oxidase homologues. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47: 189–99.
- [35] Rahman MM, El Jamali A, Halade GV, et al. Nox2 activity is required in obesity-mediated alteration of bone remodeling. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 6054361.
- [36] Bae S, Kim K, Kang K, et al. RANKL-responsive epigenetic mechanism reprograms macrophages into bone-resorbing osteoclasts. *Cell Mol Immunol*, 2023, 20: 94–109.
- [37] Pepping JK, Freeman LR, Gupta S, et al. NOX2 deficiency attenuates markers of adiposopathy and brain injury induced by high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 304: E392–404.
- [38] Zhang SX, Khalyfa A, Wang Y, et al. Sleep fragmentation promotes NADPH oxidase 2-mediated adipose tissue inflammation leading to insulin resistance in mice. *Int J Obes (Lond)*, 2014, 38: 619–24.
- [39] Lee CW, Lin CC, Lee IT, et al. Activation and induction of cytosolic phospholipase A2 by TNF- α mediated through Nox2, MAPKs, NF- κ B, and p300 in human tracheal smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 2011, 226: 2103–14.
- [40] Franchini AM, Hunt D, Melendez JA, et al. Fc γ R-driven release of IL-6 by macrophages requires NOX2-dependent production of reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 2013, 288: 25098–108.
- [41] Motta F, Barone E, Sica A, et al. Inflammaging and osteoarthritis. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2023, 64: 222–38.
- [42] Malemud CJ. Matrix metalloproteinases and synovial joint pathology. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 148: 305–25.
- [43] Xi Y, Chhabra A. We may be closer to automated Kellgren-Lawrence grading for knee osteoarthritis than we thought. *Eur Radiol*, 2025, 35: 2296–7.
- [44] van Dalen SCM, Kruisbergen NNL, Walgreen B, et al. The role of NOX2-derived reactive oxygen species in collagenase-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 26: 1722–32.
- [45] Kruisbergen NNL, Di Ceglie I, van Gemert Y, et al. Nox2 deficiency reduces cartilage damage and ectopic bone formation in an experimental model for osteoarthritis. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10: 1660.
- [46] Varlamov O. Western-style diet, sex steroids and metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863: 1147–55.
- [47] Mozaffarian D. Dietary and policy priorities for cardiovascular disease, diabetes, and obesity: A comprehensive review. *Circulation*, 2016, 133: 187–225.
- [48] Malesza IJ, Malesza M, Walkowiak J, et al. High-fat, western-style diet, systemic inflammation, and gut microbiota: A narrative review. *Cells*, 2021, 10: 3164.
- [49] Han J, Park D, Park JY, et al. Inhibition of NADPH oxidases prevents the development of osteoarthritis. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11: 2346.
- [50] Ensrud KE, Crandall CJ. Osteoporosis. *Ann Intern Med*, 2017, 167: I7c17–32.
- [51] Gao J, Wang Z, Gao P, et al. Daphnetin alleviates senile and disuse osteoporosis by distinct modulations of bone formation and resorption. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11: 2365.
- [52] Li W, Xie S, Zhong S, et al. The synergistic effect of diabetes mellitus and osteoporosis on the all-cause mortality: A cohort study of an American population. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1308574.
- [53] Shen Z, Dong W, Chen Z, et al. Total flavonoids of *Rhizoma drynariae* enhances CD31(hi)Emcn(hi) vessel formation and subsequent bone regeneration in rat models of distraction osteogenesis by activating

- PDGF-BB/VEGF/RUNX2/OSX signaling axis. *Int J Mol Med*, 2022, 50: 112.
- [54] Chen C, Xie L, Ren T, et al. Immunotherapy for osteosarcoma: Fundamental mechanism, rationale, and recent breakthroughs. *Cancer Lett*, 2021, 500: 1–10.
- [55] Mutsaers AJ, Walkley CR. Cells of origin in osteosarcoma: Mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone*, 2014, 62: 56–63
- [56] Kansara M, Teng MW, Smyth MJ, et al. Translational biology of osteosarcoma. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14: 722–35.
- [57] Biazzo A, De Paolis M. Multidisciplinary approach to osteosarcoma. *Acta Orthop Belg*, 2016, 82: 690–8.
- [58] Kitamoto K, Miura Y, Karnan S, et al. Inhibition of NADPH oxidase 2 induces apoptosis in osteosarcoma: The role of reactive oxygen species in cell proliferation. *Oncol Lett*, 2018, 15: 7955–62.
- [59] Liu Y, Li Y, Wang Y, et al. Recent progress on vascular endothelial growth factor receptor inhibitors with dual targeting capabilities for tumor therapy. *J Hematol Oncol*, 2022, 15: 89.
- [60] Yun J, Lee SH, Kim SY, et al. Antitumor activity of amivantamab (JNJ-61186372), an EGFR-MET bispecific antibody, in diverse models of EGFR exon 20 insertion-driven NSCLC. *Cancer Discov*, 2020, 10: 1194–209.
- [61] Levantini E, Maroni G, Del Re M, et al. EGFR signaling pathway as therapeutic target in human cancers. *Semin Cancer Biol*, 2022, 85: 253–75.