

应力刺激促进骨愈合作用机制的研究进展

林伟斌¹ 吴进¹ 丁真奇¹

[关键词] 应力刺激;骨折愈合;成骨细胞;破骨细胞

[中图分类号] R68 [文献标志码] A [文章编号] 1005-0205(2018)05-0082-04

在骨科研究领域中,怎样促使骨愈合一直是一个难题,众多研究表明创伤部位的应力环境对骨愈合的影响至关重要。近年来国内外对应力刺激促进骨愈合的机制研究发展迅速,已深入到分子生物学水平。其中,骨愈合过程中应力对细胞调控机制和相关细胞信号通路等是目前研究的热点,本文就应力刺激对骨折端成骨细胞和破骨细胞增殖与分化的作用和调控机制研究进展作回顾性综述。

1 应力刺激与骨愈合

Wolff 定律证实适当的应力刺激可促进骨愈合^[1],组织分化理论也认为骨折愈合受机械力学环境的影响^[2]。在临床上,大多数骨折患者因术后患肢缺乏适当的应力刺激而容易造成骨折延迟愈合或不愈合^[3]。动物实验研究也显示,应力刺激可通过细胞分子水平影响骨愈合^[4],在无任何应力刺激情况下,结果显示成骨细胞活性表达降低,破骨细胞明显增加,而通过适当应力刺激后可明显增强成骨细胞活性,从而减少骨丢失^[5,6]。因此,在骨折愈合过程中,适当应力刺激极其重要。

在骨愈合过程中,应力刺激是调节骨平衡的关键生理因素^[7]。为维持骨改建平衡,保持合适的骨量、骨强度和刚度,全身骨组织必须负荷生理范围内的适当应力^[8]。国内外许多研究者致力于力学加载条件下对骨愈合影响的研究,就应力大小和频率等也进行了深入的探索。程斌等^[9]通过计算机模拟骨愈合过程,成功获得了刺激骨痂组织生长和分化的最佳应力参数,为进一步实验研究提供了可靠依据,这项研究与喻鑫罡等^[10]的研究结果相似。

综上,适当应力刺激确实可以促进骨愈合,但应力刺激影响骨愈合的机制尚不明确。

2 应力刺激促进骨愈合的可能作用机制

应力刺激在骨折端细胞增殖、血管及骨痂形成中起重要调控作用。应力刺激不仅可以促进血管内皮细胞的生成,提供骨折端丰富的血运^[11],还可以调控成骨和破骨细胞活性的表达,同时也影响多种生长因子的表达,从而促进骨痂的生长和新骨的形成。应力刺激与骨组织类似传感受器结构,当应力刺激传至骨组织,骨组织通过繁琐的生物反应程序,如激活相应的偶联过程、反应过程和信号传递过程等完成对机械应力的作答,分泌并表达某些关键因子,对骨重建相关细胞的活性及骨组织的代谢起到重要作用^[12,13],从而促进骨痂形成来控制骨量^[14]。

3 应力刺激对成骨细胞的影响

成骨细胞是应力刺激重要的应答细胞^[15,16]。在骨形成过程中,机械应力通过影响胶原蛋白的排列增强骨强度,同时上调成骨细胞中骨钙素(Osteocalcin, OCN)、Runt 相关转录因子-2(Runt-related Transcription Factor 2, Runx2)、成骨细胞特异性转录因子 Osterix、碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP)、骨钙素(Osteocalcin, OCN)、骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)、人骨成型蛋白-2(Human Bone Morphogenetic Protein-2, BMP-2)和 I 型胶原(Collagen-I, Col-I)等成骨因子的表达,提高成骨细胞活性,进而促进细胞的增殖与分化^[17]。骨组织细胞间存在着复杂的动态平衡关系,应力刺激是调控其平衡的重要因素。大量研究已证实,机械应力刺激可以通过不同的信号通路影响成骨与破骨之间的动态平衡,从而影响骨愈合^[18-20]。

3.1 碱性磷酸酶(ALP)

适当机械应力刺激可以增强 ALP 的活性,但过度应力刺激使 ALP 的活性降低甚至丧失。ALP 是一种在碱性环境下能催化单磷酸水解的糖蛋白,它可使无机磷酸盐水解,增加局部无机磷酸浓度,促进骨的矿化,从而启动细胞外基质矿化和钙磷沉积的过程。ALP 作为成骨细胞分化成熟的关键点,其活性高表达

可以间接反映成骨细胞的功能,是最常见评价成骨细胞分泌功能的指标之一。有研究显示,机械应力刺激可增强 ALP 的活性^[21],进而使成骨细胞的增殖能力增强。当然,应力刺激的强度和频率也要适宜,过度的应力刺激会使 ALP 等成骨因子的活性丧失^[22],导致成骨失败,最终影响骨愈合。

3.2 I 型胶原蛋白(Col-I)

在骨折愈合过程中,适当应力刺激使 Col-I 分泌显著增多^[23]。Col-I 是由成骨细胞分泌且受力学调控的一种最基本的基质蛋白。在受到外界应力刺激时,Col-I 通过酶介导方式起到抵抗组织应变的作用,从而增强骨强度^[24]。当成骨细胞处于矿化阶段时,Col-I,OCN 与 OPN 等基因表达水平达到峰值,细胞外基质成熟后形成钙沉积。最后,成骨细胞被包埋其中形成骨组织。因此,细胞外基质的成熟和矿化结节的生成是形成骨组织的前提条件,而细胞外基质形成前表面细胞密度的增加和矿化水平的提高均与 Col-I 密不可分^[25,26]。在机械应力作用下,Col-I 分泌显著增多^[23],这提示应力刺激可以通过调控 Col-I 的表达,进而影响骨愈合。

3.3 核心结合因子 $\alpha 1$ (Core Binding Factor $\alpha 1$, Cbf- $\alpha 1$)

缺乏应力刺激使 Cbf- $\alpha 1$ 的 mRNA 表达活性显著降低,骨形成明显受到抑制。Cbf- $\alpha 1$ 属于 Runx 基因家族中的一员,也是成骨分化的关键因子。其作为一种特异性转录因子调控间充质干细胞向成骨细胞系分化,在成骨细胞的演变过程中作用显著。Cbf- $\alpha 1$ 在成骨细胞分化时表达上调以激活成骨特异性基因,是控制 OPN,OCN 以及 Col-I 等基因表达的关键转录因子^[23,27]。在骨形成过程中,Cbf- $\alpha 1$ 的分子基础与转化生长因子- β (TGF- β)相似,当抑制 Cbf- $\alpha 1$ 表达时,发现 TGF- β 及各种成骨特异性基因均明显减少,骨形成明显受到抑制^[28]。Cbf- $\alpha 1$ 对机械力学刺激也极其敏感,有研究表明在失重状态下,Cbf- $\alpha 1$ 和 ALP 的 mRNA 表达活性显著降低^[29]。

3.4 骨钙素(OCN)

机械应力刺激能促进 OCN 的表达,OCN 的本质是非胶原蛋白,由成骨细胞所分泌,其表达量可以直接反映成骨细胞的分化水平,提示成骨细胞已进入骨矿化发生期。体外研究显示,OCN 的产生随着成骨细胞分化和矿化的进展而增加。OCN 对钙和羟基磷灰石都有很高的亲和力,其功能是保持骨的正常矿化。最近有研究发现应力刺激能增加 OCN 的表达,进而促进成骨细胞系增殖分化和钙盐在骨中的沉积^[30]。

3.5 骨形态发生蛋白-2(BMP-2)

应力刺激促进细胞外基质中 BMP-2 的表达^[31]。BMPs 属于 TGF- β 超家族中的一员,是最强的骨诱导

因子。在 BMPs 家族成员中,BMP-2 参与了成骨与破骨的全过程,不仅具有很强的成骨能力,还调节破骨细胞活性。当然,BMP 自身还扮演着重要信号通路的角色即 BMP/Smad 信号通路,其已被证实在机械信号传导成骨细胞过程中发挥监管作用^[32]。体外研究发现,成骨细胞在应力刺激作用下不仅可以促进细胞外基质中的 BMP-2 和 BMP-4 的表达^[33],还可以上调 ALP 和 Col-I mRNA 的表达水平^[34]。因此,BMP-2 对应力刺激敏感性应答后发挥其特殊的成骨能力,从而促进骨愈合。

4 应力刺激对破骨细胞的影响

破骨细胞来源于骨髓中的造血干细胞,是骨基质吸收的唯一功能细胞^[35]。与成骨细胞相似,力学刺激同样参与调控破骨细胞形成、活化等过程。适当应力刺激可抑制破骨细胞活性的表达,促进骨形成^[36],改变骨组织动态平衡,利于成骨。

4.1 抗酒石酸酸性磷酸酶(Tartrate Resistant Acid Phosphatase, TRAP)

应力刺激可诱导 TRAP 的表达且存在时间依赖性。TRAP 作为检测破骨细胞数量和活性的生化标志物,具有调节骨基质吸收和胶原蛋白转化的功能^[37],在骨骼发育过程中起关键作用。有研究发现 TRAP 受机械力学诱导,且破骨细胞活性表达强度与应力刺激时间长短有关,研究显示只有刺激达到一定时间后 TRAP 的表达量明显增加,提示破骨细胞开始出现明显活化^[38]。另外,也有文献支持骨组织受到应力刺激时,TRAP 的表达也明显减少,成骨细胞分化功能受到抑制^[35]。这些实验结果的差异可能来源于对应力加载的方式及应力参数不同所致。

4.2 骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)/核因子 κB 受体活化因子配体(Receptor Activator for Nuclear Factor- κB Ligand, RANKL)

缺乏应力刺激导致骨丢失的发生与 OPG/RANKL/RANK 系统紧密相关^[39,40]。OPG 和 RANKL 均由破骨细胞分泌,在正常骨组织中两者处于动态平衡,且 OPG/RANKL 的比值相对固定。不同的是,OPG 对破骨细胞分化起到抑制作用,通过与 RANK 竞争性结合 RANKL,减弱破骨活化作用,从而起到保护骨的作用。而 RANKL 是破骨细胞成熟的关键因子,对破骨细胞分化及骨吸收有促进作用。有实验研究发现应力刺激产生的 OPG 存在时间依赖性,早期 OPG 明显增多,但随后逐渐恢复到基础水平^[41]。故在体外实验研究中,若想观察 OPG 最佳的表达量,必须选择合适的时间进行检测。亦有研究发现在失重条件下 RANKL 表达明显增加^[42],更有利于破骨细胞分化,从而导致骨质丢失。因此,OPG/RANKL/RANK 系统在骨愈合过程中的重要性不言

而喻,并且在临床上可以通过调节该系统的紊乱来减少骨丢失,从而更好地服务于患者。

当然,在目前对破骨细胞的研究中,机械应力不仅可以调节 TRAP,OPG 及 RANKL 因子,还调控组织蛋白酶 K(Cathepsin K)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、MMP-9 等破骨相关因子。CATK,M-CSFE 及 MMP-9 在不同频率的应力作用下,同样也出现明显变化^[43]。

5 总结与展望

综上所述,在探索应力刺激与骨组织改建过程中,大多数研究者认为机械应力能够直接作用于成骨细胞及破骨细胞,或通过间充质干细胞及相关的骨代谢信号转导通路来间接调控成骨细胞及破骨细胞的增殖与分化,进一步影响骨愈合。回顾最新文献可知,适当应力刺激确实可以促进 ALP,Col-I 及 Cbf- α 1 等成骨因子表达和抑制 TRAP,RANKL 及 M-CSF 等破骨因子生成,从而影响骨愈合。然而,何为适当应力?目前对其研究没有较为明确的统一标准,具有探索性。在应力作用下,骨组织细胞是怎样感应力学的传导?其作用机制如何?目前研究尚不明确。大量文献已经证实,在骨愈合过程中存在多条信号通路介导(如 BMP/Smad,Wnt 通路等),到底有没有主导通路影响其他的信号通路传导?且是否存在哪一条信号通路对应应力刺激最敏感?这些问题在未来的实验研究中仍需要更深入的探索。

参考文献

- [1] Middleton KAJ, Ma YH, You L. Chapter 14: measuring bone cell response to fluid shear stress and hydrostatic/dynamic pressure[J]. *Experimental Methods in Orthopaedic Biomechanics*, 2017; 217-232.
- [2] Khayyeri H, Isaksson H, Prendergast PJ. Corroboration of computational models for mechanoregulated stem cell differentiation[J]. *Computer Methods in Biomechanics & Biomedical Engineering*, 2015, 18(1): 15-23.
- [3] Gustafsson A, Schilcher J, Grassi L, et al. Strains caused by daily loading might be responsible for delayed healing of an incomplete atypical femoral fracture[J]. *Bone*, 2016, 88: 125-130.
- [4] Trüssel A, Müller R, Webster D. Toward mechanical systems biology in bone[J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2012, 40(11): 2475-2487.
- [5] Wang HH, Ma YJ, Liu Y, et al. Preventing effect of short-time direct mechanical loading stimulation against bone loss of hind-limb unloaded rats[J]. *Space Medicine & Medical Engineering*, 2011, 24(1): 9-12.
- [6] Wang XQ, Zhang WP. Effect of treadmill training at different time after hindlimb unloading on bone mineral density of rat femurs and markers of bone metabolism[J]. *Journal of Beijing Sport University*, 2013.
- [7] Yuan Y, Zhang L, Tong X, et al. Mechanical stress regu-

- lates bone metabolism through micrnas[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2017, 232(6): 1239.
- [8] Wittkowske C, Reilly GC, Lacroix D, et al. In vitro bone cell models: Impact of fluid shear stress on bone formation[J]. *Frontiers in Bioengineering & Biotechnology*, 2016, 4(Pt 7).
- [9] 程斌,丁真奇,姚小涛,等. 轴向应力促进胫骨骨折愈合的三维有限元力学参数优化研究[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2016, 31(8): 839-842.
- [10] 喻鑫罡,张先龙,曾炳芳. 低频可控性微动影响长骨骨折愈合的实验研究[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2005, 7(8): 744-748.
- [11] Liu C, Cui X, Ackermann TM, et al. Osteoblast-derived paracrine factors regulate angiogenesis in response to mechanical stimulation[J]. *Integr Biol*, 2016, 8(7): 785.
- [12] Zhang JK, Yang L, Meng GL, et al. Protection by salidroside against bone loss via inhibition of oxidative stress and bone-resorbing mediators [J]. *Plos One*, 2013, 8(2): e57251.
- [13] Oers RFMV, Wang H, Bacabac RG. Osteocyte shape and mechanical loading [J]. *Current Osteoporosis Reports*, 2015, 13(2): 61-66.
- [14] Shao YY, Wang L, Welter JF, et al. Primary cilia modulate ihh signal transduction in response to hydrostatic loading of growth plate chondrocytes[J]. *Bone*, 2012, 50(1): 79-84.
- [15] Chang WH, Li JK, Lin JCA. Biological response of low intensity ultrasound stimulation on osteoblasts (cellular & tissue engineering[C]//Proceedings of the Asian Pacific Conference on Biomechanics: emerging science and technology in biomechanics, 2017.
- [16] Matsumoto K, Shimo T, Kurio N, et al. Low-intensity pulsed ultrasound stimulation promotes osteoblast differentiation through hedgehog signaling[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2017.
- [17] Wang QS, Zhang XC, Li RX, et al. A comparative study of mechanical strain, icariin and combination stimulations on improving osteoinductive potential via nf-kappab activation in osteoblast-like cells [J]. *Biomedical Engineering Online*, 2015, 14(1): 46.
- [18] Liu L, Cai S, Qiu G, et al. Fluid shear stress enhances the cell volume decrease of osteoblast cells by increasing the expression of the clc-3 chloride channel [J]. *Biomedical Reports*, 2016, 4(4): 408.
- [19] Ehnes DD, Price FD, Shrive NG, et al. Embryonic stem cell-derived osteocytes are capable of responding to mechanical oscillatory hydrostatic pressure[J]. *Journal of Biomechanics*, 2015, 48(10): 1915-1921.
- [20] Lei L, Zhang L, Zhao Y, et al. Advances in effects of mechanical stress on osteoclasts[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2017.
- [21] Yourek G, McCormick SM, Mao JJ, et al. Shear stress in-

- duces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *Regenerative Medicine*, 2010, 5(5): 713.
- [22] Wan ZM, Liu L, Li JY, et al. Mechanical stimulus inhibits the growth of a bone tissue model cultured in vitro Δ [J]. *Chinese Medical Sciences Journal*, 2013, 28(4): 218-224.
- [23] Qin J, Hua Y. Effects of hydrogen sulfide on the expression of alkaline phosphatase, osteocalcin and collagen type i in human periodontal ligament cells induced by tension force stimulation[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 14(4): 3871-3877.
- [24] Carlisle CR, Coulais C, Guthold M. The mechanical stress-strain properties of single electrospun collagen type i nanofibers[J]. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(8): 2997-3003.
- [25] Keogh MB, O'Brien FJ, Daly JS. A novel collagen scaffold supports human osteogenesis-applications for bone tissue engineering[J]. *Cell & Tissue Research*, 2010, 340(1): 169-177.
- [26] Uchihashi K, Aoki S, Matsunobu A, et al. Osteoblast migration into type i collagen gel and differentiation to osteocyte-like cells within a self-produced mineralized matrix; a novel system for analyzing differentiation from osteoblast to osteocyte[J]. *Bone*, 2013, 52(1): 102.
- [27] Duan X, Xu H, Wang Y, et al. Expression of core-binding factor $\alpha 1$ and osteocalcin in fluoride-treated fibroblasts and osteoblasts[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine & Biology*, 2014, 28(3): 278-283.
- [28] Chang JL, Brauer DS, Johnson J, et al. Tissue-specific calibration of extracellular matrix material properties by transforming growth factor- β and runx2 in bone is required for hearing[J]. *Embo Reports*, 2010, 11(10): 765-811.
- [29] Dai Z, Guo F, Wu F, et al. Integrin $\alpha v \beta 3$ mediates the synergistic regulation of core-binding factor $\alpha 1$ transcriptional activity by gravity and insulin-like growth factor-1 through phosphoinositide 3-kinase signaling[J]. *Bone*, 2014, 69: 126.
- [30] Huang Y, Niu X, Song W, et al. Combined effects of mechanical strain and hydroxyapatite/collagen composite on osteogenic differentiation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. *Journal of Nanomaterials*, 2013(19): 7.
- [31] Itoi T, Harada Y, Irie H, et al. Escherichia coli-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 combined with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells improves bone regeneration in canine segmental ulnar defects[J]. *Bmc Veterinary Research*, 2016, 12(1): 201.
- [32] Li Y, Li R, Hu J, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 suspended in fibrin glue enhances bone formation during distraction osteogenesis in rabbits[J]. *Archives of Medical Science Ams*, 2016, 12(3): 494-501.
- [33] Guo Y, Zhang CQ, Zeng QC, et al. Mechanical strain promotes osteoblast ecm formation and improves its osteoinductive potential[J]. *BioMedical Engineering OnLine*, 2012, 11(1): 80.
- [34] Lu HF, Mai ZH, Xu Y, et al. Mechanical loading induced expression of bone morphogenetic protein-2, alkaline phosphatase activity, and collagen synthesis in osteoblastic mc3t3-e1 cells[J]. *Chinese Medical Journal*, 2012, 125(22): 4093-4097.
- [35] Liu C, Li S, Ji B, et al. Flow-induced migration of osteoclasts and regulations of calcium signaling pathways[J]. *Cellular & Molecular Bioengineering*, 2015, 8(1): 213-223.
- [36] Li J, Wan Z, Liu H, et al. Osteoblasts subjected to mechanical strain inhibit osteoclastic differentiation and bone resorption in a co-culture system[J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2013, 41(10): 2056-2066.
- [37] Choi J, Choi SY, Sun YL, et al. Caffeine enhances osteoclast differentiation and maturation through p38 map kinase/mitf and dc-stamp/ctsk and trap pathway[J]. *Cellular Signalling*, 2013, 25(5): 1222-1227.
- [38] Huang S, Ling T, Zhong X, et al. Effect of compressive stress on the expression of dnax-activating protein 12 and tartrate-resistant acid phosphatase in mouse monocyte raw264. 7[J]. *West China Journal of Stomatology*, 2013, 31(4): 360.
- [39] Ugay L, Kochetkova E, Nevzorova V, et al. Role of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor- κb ligand in bone loss related to advanced chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Chinese Medical Journal*, 2016, 129(14): 1696-1703.
- [40] Wang C, Shan S, Wang C, et al. Mechanical stimulation promote the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells through epigenetic regulation of sonic hedgehog[J]. *Experimental Cell Research*, 2017, 352(2): 346-356.
- [41] You L, Temiyasathit S, Lee P, et al. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading[J]. *Bone*, 2008, 42(1): 172-179.
- [42] Di S, Meng R, Qian A, et al. Impact of osteoclast precursors subjected to random positioning machine on osteoblasts[J]. *Journal of Mechanics in Medicine & Biology*, 2012, 12(4): 201.
- [43] Chen G, Chen J, Huang W. Effects of different frequency of vibration strain on the expressions of osteoclast-specific genes and osteoprotegerin/receptor of activator for nuclear factor- κb ligand in osteoclast[J]. *Chinese Journal of Rehabilitation Medicine*, 2014.