

· 综述 ·

体外冲击波与成骨细胞生长因子的研究进展

王五洲 邢更彦

自 20 世纪 90 年代初,人们发现体外冲击波(extracorporeal shock wave, ESW, 又称体外震波)可诱导成骨以来,体外冲击波疗法(extracorporeal shock wave therapy, ESWT)便逐渐被临床所接受。目前,ESWT 已广泛用于骨缺损、骨不连、骨折延迟愈合、肩周炎、高尔夫球肘、网球肘、弹响髌、跳跃膝、跟痛症及跖筋膜炎等的无创性非手术治疗^[1,2]。近年来,邢更彦等^[3]又将 ESWT 用于成人股骨头缺血性坏死 I ~ III 期(Ficat 分期)的保守治疗。然而,有关 ESWT 治疗骨组织疾病、促进成骨的机制仍不十分清楚,许多基础研究工作也仍在进行中^[4],目前的研究主要集中在 ESW 诱导成骨细胞生长因子等方面。现将 ESW 的作用机制及其对参与成骨和信号转导等方面的细胞生长因子的作用综述如下。

ESW 的作用机制

ESW 是一种兼具声、光、力学特性的机械波。ESW 在不同密度物质中的声阻抗和传导速度不同,能在界面上产生应力作用。冲击波具有光的传播特性,可以通过特定的半椭圆球反射体将冲击波机械聚焦,经水囊内液体传递,作用于病患局部。冲击波多由电极高压放电产生,本身携带巨大的能量,通过二次聚焦产生不同的物理效应。目前关于体外冲击波治疗骨关节疾患的作用机理还不十分明确,人们初步认为 ESW 具有以下作用:(1)体外冲击波在脂肪、肌腱、韧带及骨骼等不同组织的界面处产生不同的机械应力效应,对细胞产生不同的拉应力和压应力。拉应力可以引起组织间的松解,促进微循环;压应力可以使细胞弹性变形,增加细胞摄氧,从而达到治疗目的。(2)体外冲击波通过增大骨组织的机械应力,产生极化电位,引起压电效应。高能量可以引起动物的骨骼骨折,低能量可以刺激骨的生成。(3)人体组织中所含的大量微小气泡在冲击波的作用下急速膨胀、破裂,出现高速液体微喷射,产生撞击后空化效应,这种空化效应有利于闭塞微血管的疏通和粘连组织的松解。(4)体外冲击波可直接抑制神经末梢细胞,改变痛觉感受器的接受频率及周围化学介质的组成,从而抑制疼痛信息的传递,缓解疼痛。

ESW 对成骨细胞生长因子的作用

一、转移生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)

TGF- β 是一类具有多种功能的多肽,它在调控成骨细胞分泌细胞因子、细胞外基质的生成及细胞成熟等方面分别发挥着不同的功能。首先,TGF- β 与其 II 型受体(T β R-II)二聚体结合形成复合物,随后 TGF- β I 型受体(T β R-I)也以二聚体形式与 TGF- β 结合,结果 T β R-II 使 T β R-I 的 GS 结构域磷酸化。TGF- β 最终通过诱发一些靶基因的转录来发挥其生物学效应。当

TGF- β 等刺激细胞后,T β R-I 使限制性 Smads 磷酸化,抑制性 Smads 的 mRNA 被转录诱导,移至细胞核后调节靶基因转录。TGF- β 也可激活 MAPK 信号通路,其作用类似骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMP)。多数学者认为,TGF- β 可积聚在骨发生之前的软骨化骨过程中,调节碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)、II 型胶原(Collagene II, Col-II)及其它组织特殊蛋白质的表达。Chen 等^[5]用 0.16 mJ/mm²、500 频次的 ESW 作用于股骨干缺损部位,在不同时期观察缺损区骨组织及细胞的形态学变化,并检测 TGF- β_1 的表达。结果发现经 ESWT 作用后 3 d, TGF- β_1 的 mRNA 表达即明显增加($P < 0.05$),高表达的 TGF- β_1 持续 28 d 后迅速下调。

TGF- β 不仅对细胞的增殖分化具有调节作用,还是一种作用较强的成骨细胞趋化因子,可以使成骨细胞由 TGF- β 低浓度区向高浓度区域移动和聚集。Wang 等^[6]观察了大鼠股骨经 ESW 作用后成骨母细胞集落形成单位、基质细胞集落形成单位和全血细胞集落形成单位的增殖和分化,发现 0.16 mJ/mm²、500 频次的 ESW 对前两者有刺激作用,对后者却无作用。ESWT 可使骨髓基质细胞中 AKP 的活性增强, TGF- β_1 阳性表达增加;在 TGF- β_1 诱导下,骨髓基质细胞生长加快,迅速向成骨母细胞分化^[7]。由此可见,在 ESWT 促进成骨的过程中, TGF- β_1 可能起着趋化和加速骨髓基质细胞有丝分裂的作用。

二、BMP

BMP 是目前已知的唯一能促使骨髓间充质干细胞向骨或软骨细胞分化的生长因子。BMP 信号作用于跨膜丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)激酶受体,并与之结合形成两种受体的异聚体复合物,活化 Smad 分子;同时, II 型受体能磷酸化 I 型受体,进一步将信号传递到 Smad 途径。磷酸化的受体调节型 Smad(receptor regulated Smad, RSmad)从膜受体上脱离,与共同型 Smad(common Smad, CSmad)结合后进入细胞核。随后, Smad 异聚体复合物在其它 DNA 结合蛋白的参与下作用于特异的靶基因,发挥其转录调节功能^[8]。Wang 等^[9]用 500 频次、0.16 mJ/mm² 的 ESW 刺激大鼠股骨干的骨缺损处,用免疫组化及 RT-PCR 等方法动态检测股骨和骨痂中 BMP 的表达情况。结果发现,4 种 BMP 蛋白分子表达均增高;骨髓间充质干细胞和未成熟软骨细胞中 BMP-2、BMP-3、BMP-4 的免疫组化染色呈强阳性;骨痂连接部位的成骨细胞 BMP-7 阳性表达明显。Chen 等^[10]的动物实验也表明,理想能流密度的 ESW 能增加骨缺损部位骨痂和骨密质的形成量,并提高骨密度,进而促进骨形成;在密质骨形成过程中, TGF- β 和 BMP 的表达也随之增高。由此可见, BMP 在 ESWT 促进成骨细胞增殖和骨再生的活动中发挥重要作用。

BMP 信号还可以通过联结细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)蛋白,激活整合素-粘着斑激酶-MAPK 通路,进而激发成骨母细胞向骨及软骨细胞分化。BMP-2 可以激活细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)及 P38 通路,其中 P38 介导 BMP-2 时,纤连蛋白(Fibronectin, Fn)、

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30371430);首都医学发展科研基金资助项目(No. 2002-3037)

作者单位:100039 北京,武警总医院骨科(王五洲现工作单位为武警 8662 部队)

Col-II、骨桥蛋白、骨钙素 (bone gal protein, BGP) 及 AKP 等上调, 而 ERK 仅上调 Fn 和骨桥蛋白。Chen 等^[11] 将 ESW 作用于骨缺损部位, 通过测定骨痂中 γ -³² 磷酸转移酶活性, 证实 ERK 和 P38 被激活, 密质骨的形成与 ERK 和 P38 的磷酸化成正比; 而且新生骨的骨髓和骨皮质中磷酸化 ERK 持续存在, 活化的 P38 在软骨细胞增殖期明显表达活跃。由此可见, 在 ESW 诱导成骨的过程中, BMP-2 的功能十分活跃。

三、核结合因子- α_1 (core binding factor- α_1 , CBF- α_1)

CBF- α_1 是一种在成骨母细胞系中特异表达的转录编码基因, 是成骨母细胞分化不可缺少的激活因子。存在 CBF- α_1 缺陷的小鼠全身骨骼中缺少成骨母细胞, 不能形成骨组织。CBF- α_1 还是成骨细胞分化及功能调控的核心因子, 是成骨细胞分化过程中出现最早、且最具特异性的标志。CBF- α_1 对调控分化成熟的成骨细胞中骨钙素的基因表达有重要作用。另外, CBF- α_1 基因还可以通过对自身启动子的负反馈来实现自身调控^[12]。ESWT 可能通过 MAPKs 途径实现其对 CBF- α_1 成骨转录功能的调节, 这种作用既能增强 CBF- α_1 基因的表达, 又能提高 CBF- α_1 蛋白与 DNA 的结合力。Wang 等^[13] 通过动物实验发现, ESWT 可以提高 ERK 活性, 促进成骨母细胞的分化; 用超氧化物清除 O_2^- 和用 PD98059 抑制 MAPK 通路中 ERK 的磷酸化, 结果特异性成骨转录因子 CBF- α_1 和 TGF- β_1 的表达降低。可见 ESW 可使酪氨酸激酶介导的 MAPK 通路激活, 从而引起 O_2^- 的产生和 CBF- α_1 的活化, 促进成骨母细胞的生长和成熟。他们还用最佳能量密度的 ESW 刺激骨髓基质细胞, 5 min 后细胞膜发生快速超极化, 30 min 内 Ras 系统被激活, 2 h 后细胞开始增殖, 6 d 后 AKP 升高, 12 d 后 CBF- α_1 和 BGP mRNA 出现阳性表达。特异性成骨转录因子 CBF- α_1 的阳性表达将 ESW 与生物膜介导的 Ras 系统相联系, 提示 CBF- α_1 可能在 ESW 促进骨折愈合、减轻骨坏死及治疗骨关节慢性损伤过程中起着关键性作用^[14]。

四、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)

VEGF 是目前所知唯一能特异性作用于血管内皮的细胞因子。缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor, HIF-1) 是其中的一个重要媒介, 在机体内介导缺氧诱导基因的调控。VEGF 选择性地作用于血管内皮细胞上的 III 型酪氨酸激酶受体, 其主要分布在正常组织的血管内皮细胞, 能催化域内有酪氨酸激酶插入区, 该酪氨酸激酶的活性通过受体与配体结合而激活, 并经受体磷酸化而发挥生物学效应^[15]。VEGF, 尤其是 VEGF164 和 VEGF188 的缺乏, 不仅会影响骨组织的血管生成, 还会阻碍成骨细胞、软骨细胞和破骨细胞的分化。Wang 等^[16] 用 NADPH 氧化酶阻断法证实, 经 ESW 作用后, 成骨细胞中 HIF-1 α 和 VEGF-A 的分泌水平升高, 而且 VEGF 与 HIF-1 α 表达呈正相关。该研究小组在另一实验中将 50 只体重为 2.5 ~ 3.5 kg 的新西兰大白兔后腿制成腱鞘炎模型, 其右腿接受 ESW 治疗, 左腿为对照侧不接受 ESW 治疗, 然后分期分批地检测其新生血管的数量和 VEGF 及内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 的表达。结果显示, ESW 治疗侧新生血管的生成量及 PCNA、VEGF 和 eNOS 的表达明显高于对照侧; 治疗 1 周后, eNOS 和 VEGF 即增加, 12 周后才开始减少; PCNA 和新生血管从第 4 周开始增加, 并持续至第 12 周。由此可见, 冲击波可诱导实验兔腱膜连接处新生血管的长入, 进而增加骨-腱连接部位血液供应, 促进组织再生^[17]。另外,

VEGF 的表达还可能与细胞信号调控, 如 Smad 通路等有关, 这有待进一步的深入研究。

其它与成骨相关的生长因子

一、胰岛素样生长因子 (Insulin-like growth Factor, IGF)

IGF 是长骨生长的一种必需因子。IGF 可以刺激成骨细胞的增殖与分化, 提高 AKP 活性, 促进 Col-I 和 BGP 的合成^[18]。IGF-I 的主要作用是增强成骨细胞活性, 促进成骨细胞合成 Col-I 及抑制胶原酶基因的转录, 但对成骨细胞的增殖作用较弱。IGF-II 对成骨细胞的作用通过 IGF-I 受体传递, 因其与 IGF-I 受体的亲和力较低, 故生理效应较 IGF-I 要低得多。IGF-II 的主要功能是促进成骨细胞的增殖、分化和募集^[19]。

二、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)

研究发现, FGF 对成骨细胞的作用与细胞分化的成熟程度有关, 即 FGF 可促进未成熟的成骨细胞分化和增殖、AKP 和骨钙素表达上调和矿化结节形成, 但对那些处于产生 ECM、并不断上调 AKP 表达的成骨细胞, FGF 反而抑制其 AKP 的表达和 DNA 的合成, 并最终诱导成骨细胞凋亡。已有研究表明, 一些物理因素可以刺激 FGF 的分泌, 进而影响细胞的增殖、分化, 而且这种作用是双向的, 即低剂量能促进成骨细胞的增殖, 而高剂量则无促进作用, 甚至会抑制成骨细胞的增殖^[20, 21]。

三、血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)

PDGF 是一种多功能的细胞生长因子, 它通过自分泌和旁分泌的方式, 经膜表面受体信号转导途径调控细胞的增殖与分化, 在许多生理和病理过程中有着重要的作用。PDGF 是成骨过程中潜在的细胞调节剂, 既可以通过加速细胞周期、诱导静止期细胞进入增殖阶段而促进骨及软骨细胞分裂增殖和胶原蛋白的合成, 又可通过调节破骨细胞的骨吸收速度来参与骨重建过程。PDGF 还可以间接地诱导血管内皮细胞增殖与血管再生。有研究表明, 低强度的脉冲超声波等物理刺激可以增加 PDGF 分泌, 进而促进间充质细胞的增殖分裂和迁移运动^[22]。

四、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)

Chien 等^[23] 在诱导 MC₃T₃ 细胞向成骨细胞分化的试验中发现, 人 EGF 接合位点会随着细胞分化的进程迅速减少; 高分化的 ROS 细胞无 EGF 受体, 因此认为 EGF/EGF 受体对成骨细胞有表型抑制及促进增殖的作用。

结 语

在生物体内, 骨细胞同时受到多种成骨细胞生长因子的调节。这些成骨细胞生长因子中的大部分能提高成骨细胞活性, 促进其增殖与分化, 但任何一种成骨生长因子都无法单独产生促进骨形成的作用^[24]。因此, 骨细胞对 ESWT 生物学效应的感知和应答过程中有 TGF- β_1 、BMP、CBF- α_1 、VEGF 等多种生长因子的参与, 并涉及多种信号转导通路, 它们之间相互作用和相互影响, 形成了复杂的网状系统。ESWT 对该系统的激活、调控和反馈方式及影响因素等均处于初步探索阶段, 还有待更为深入的研究。

参 考 文 献

- 1 Thiel M. Application of shock waves in medicine. Clin Orthop, 2001,

- 387:18-21.
- 2 毛玉琰,黄东锋,徐光青,等. 高能震波治疗肌肉骨关节慢性疼痛性疾病的临床研究. 中华物理医学与康复杂志,2003,25:727-730.
- 3 邢更彦,白晓东,杜明奎,等. 体外冲击波治疗成人股骨头缺血性坏死的疗效观察. 中华物理医学与康复杂志,2003,25:472-474.
- 4 李明亮,高根德. 体外冲击波治疗家兔股骨头坏死的实验研究. 中华物理医学与康复杂志,2004,26:648-651.
- 5 Chen YJ, Wurtz T, Wang CJ, et al. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. J Orthop Res,2004,22:526-534.
- 6 Wang FS, Yang KD, Chen RF, et al. Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF-beta1. J Bone Joint Surg Br,2002,84:457-461.
- 7 胡军,张爱斌,刘晓岚,等. 冲击波诱导人骨髓基质细胞成骨分化及机制的研究. 中华实验外科杂志,2005,22:147-150.
- 8 Yamashita H, Miyazono K. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. Nippon Rinsho,1999,57:220-226.
- 9 Wang FS, Yang KD, Kuo YR, et al. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic proteins in extracorporeal shock wave-promoted healing of segmental defect. Bone,2003,32:387-396.
- 10 Chen YJ, Kuo YR, Yang KD, et al. Shock wave application enhances pertussis toxin protein-sensitive bone formation of segmental femoral defect in rats. J Bone Miner Res,2003,18:2169-2179.
- 11 Chen YJ, Kuo YR, Yang KD, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 kinase in shock wave-promoted bone formation of segmental defect in rats. Bone,2004,34:466-477.
- 12 Drissi H, Luc Q, Shakoori R, et al. Transcriptional autoregulation of the bone related CBFalpha1/RUNX2 gene. J Cell Physiol,2000,184:341-350.
- 13 Wang FS, Wang CJ, Sheen-Chen SM, et al. Superoxide mediates shock wave induction of ERK-dependent osteogenic transcription factor (CBFalpha1) and mesenchymal cell differentiation toward osteoprogenitors. J Biol Chem,2002,277:10931-10937.
- 14 Wang FS, Wang CJ, Huang HJ, et al. Physical shock wave mediates membrane hyperpolarization and Ras activation for osteogenesis in human bone marrow stromal cells. Biochem Biophys Res Commun,2001,287:648-655.
- 15 Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. Bone,2002,30:472-477.
- 16 Wang FS, Wang CJ, Chen YJ, et al. Ras induction of superoxide activates ERK-dependent angiogenic transcription factor HIF-1alpha and VEGF-A expression in shock wave-stimulated osteoblasts. J Biol Chem,2004,279:10331-10337.
- 17 Wang CJ, Wang FS, Yang KD, et al. Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction. A study in rabbits. J Orthop Res,2003,21:984-989.
- 18 李云霞,陈世益,马昕,等. 外源性胰岛素样生长因子促进骨骼肌损伤修复的实验研究. 中华物理医学与康复杂志,2002,24:147-148.
- 19 Langdahl BL, Kassem M, Moller MK, et al. The effects of IGF-I and IGF-II on proliferation and differentiation of human osteoblast and interactions with growth hormone. Eur J Clin Invest,1998,28:176-183.
- 20 Mansukhani A, Belloso P, Sahni M, et al. Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. J Cell Biol,2000,149:1297-1308.
- 21 索伟,郭海燕,王兴林. 短波紫外线照射对局部碱性成纤维细胞生长因子表达的影响. 中华物理医学与康复杂志,2003,25:651-654.
- 22 Wang W, Zhuang H, Levitz CL, et al. The increased level of PDGF-A contributes to the increased proliferation increased by mechanical stimulation in osteoblastic cell. Biochem Mol Biol Int,1997,43:339-346.
- 23 Chien HH, Lin WL, Cho MI. Down-regulation of osteoblastic cell differentiation by epidermal growth factor receptor. Calcif Tissue Int,2000,67:141-150.
- 24 周智勇,赵学琴,刘云鹏,等. 体外震波治疗骨延迟愈合或不愈合的研究进展. 中华物理医学与康复杂志,2003,25:509-510.

(修回日期:2005-11-02)
(本文编辑:吴倩)

· 临床研究 ·

早期康复联合药物治疗急性脑梗死的临床研究

张磊 梅元武

脑卒中是严重危害人类健康的常见病,且致残率高达72.5%~75.0%^[1]。不仅给患者带来极大的痛苦,而且给家庭和社会带来沉重的负担。为了降低致残率,提高患者的生存质量,我们应用早期康复联合药物治疗急性脑梗死患者40例,取得了良好效果,现报道如下。

资料与方法

一、一般资料

2002年9月至2004年8月在我科住院的急性脑梗死患者80例,其中男49例,女31例;平均年龄为55.6岁;基底节区梗死53例,最大层面面积为(0.4×0.5)~(2.0×2.0)cm²,颞、

顶、额叶等脑叶梗死27例,最大层面面积为(2.5×3.5)~(5.5×7.0)cm²。全部患者均符合全国第四届脑血管疾病会议通过的关于脑梗死的诊断标准^[2],并经头颅CT或MRI证实。入选标准:起病3d,有运动功能障碍及神经功能缺损。排除标准:有出血性脑梗死,大面积脑梗死(涉及颈内动脉主干、大脑中动脉主干的完全性卒中),严重的肝、肾损害,严重的高血压(收缩压>200 mmHg,舒张压>110 mmHg),消化系统溃疡及出血或血小板计数<8万。将80例患者随机分为早期康复组(康复组)和对照组,每组40例。

二、治疗方法

在常规治疗的基础上,2组患者均用丹奥(丹东制药厂生产)120 mg加入5%葡萄糖或生理盐水中静脉滴注,每日1次,连续给药2周。

康复组患者在入院后1d、生命体征稳定、病情无进行性加

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科