

· 综述 ·

力学刺激在骨组织中的信号转导

叶超群 纪树荣

骨能在人体发育和成熟的过程中,不断地自我调整其形状、数量、质量和结构,以适应不断增加和变化的力学环境需要。因此,力学刺激是骨生长与重塑的重要参与因素,二者间的关系及其作用机制是近 10 年来的研究热点之一,且仍有许多未知领域等待人们去探索。

力学刺激对骨组织的作用

骨的生物学特性取决于应力与应变的关系,而骨重建又包括塑型与重塑型两种类型。塑型改变骨量,其形式取决于机械受力与应力,重塑型则是按吸收与形成的顺序更新骨组织。破骨细胞和成骨细胞在骨的吸收与形成过程中起着重要作用。在组织水平上,成骨细胞与破骨细胞通过应变相耦联,并根据应变的大小而分别发挥功能。有研究发现,人体骨重建阈值为 200 微应变($\mu\epsilon$),塑建阈值为 1 000 $\mu\epsilon$,当外力作用为 200 ~ 1 000 $\mu\epsilon$ 时,骨组织处于适应状态;但在体外,需要较大强度的力学刺激才可引起所培养的成骨细胞和骨组织处于适应状态^[1]。

外力的大小是决定骨量增减的主要因素,生理强度的力学刺激可促进骨的增殖和分化,超生理量的负荷则抑制骨的形成。有研究发现,2 000 $\mu\epsilon$ 的负荷量可引起小牛骨膜细胞表现出成骨样细胞特性,骨性胞外基质蛋白(包括骨连接蛋白、I 型胶原蛋白和降钙素)的表达和细胞增殖较静止的对照组高;而 10 000 $\mu\epsilon$ 的负荷则抑制骨的再生^[2]。大鼠的在体实验显示,0.4 Hz、500 $\mu\epsilon$ 的 24 h 周期性牵拉可促进成骨细胞增殖,使³H-脯氨酸掺入量增多,碱性磷酸酶活性和细胞外分泌钙增加;而当频率与时间相同时,1 000 $\mu\epsilon$ 的牵拉则产生抑制效应^[3]。

外力的频率和作用方式是影响力学刺激对骨作用的重要因素^[4]。相关研究显示,在机械振动和牵拉刺激中,低频刺激可提高成骨细胞的活性,促进其增殖和分化,而高频刺激则抑制成骨细胞的增殖与活性^[5]。江建明等^[6,7]发现低频振动可促进骨折愈合,他们进一步采用体外分离培养和纯化的人成骨细胞,分别给予 0.5 Hz 和 2 Hz 频率的振动,5 d 后发现 0.5 Hz 组 S 期细胞由 10.40% 增加到 16.12%,增殖指数由 20.14% 增加到 28.75%,而 2 Hz 组 S 期细胞降至 8.56%,增殖指数降至 17.68%,2 组前列腺素 E_2 (prostaglandin E_2 , PGE_2) 和一氧化氮(carbon monoxide, NO)水平均上升;14 d 后,0.5 Hz 组中成骨细胞间质的钙离子浓度明显提高,而 2 Hz 组则无明显变化。另有研究发现,大鼠的成骨细胞对 0.2 Hz 频率的刺激较 1 Hz 和 2 Hz 更敏感^[2]。

有研究利用特制的装置对成年雌性 SD 大鼠右侧尺骨进行压缩,产生频率为 2 Hz、最大力为 17 N 的正弦波刺激,实验动物每日接受 360 个循环、每周 3 d、共 16 周的刺激,其中一组每日

连续接受 360 个循环的刺激,另一组每日分 4 次给予刺激,结果显示 2 种方案的压缩刺激均能改善骨的结构和生物力学性能,而分次给予刺激组的效果显著优于连续给予刺激组,提示分次给予骨组织负荷产生的成骨作用较一次性给予好^[8]。Srinivasans 等^[9]采用相似的加载方式对 2 种不同的动物模型进行研究,发现对鸟的尺骨模型给予 3 d 连续的低强度刺激后,加载侧尺骨骨膜标记表面较未加载侧提高 2 倍($P < 0.05$),而分次给予负荷后,骨膜标记表面较连续加载时明显增加($P < 0.05$);对鼠的胫骨模型给予 5 d 连续的低强度刺激,骨形成率(bone formation rate, BFR)与未加载侧比较,呈降低趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$),而分次给予刺激后, BFR 较未加载侧显著提高($P < 0.05$)。作者认为分次给予低强度负荷(其间休息 10 s)可显著提高成骨效应。由此可见,骨对动态应变比较敏感。还有学者认为,动态应变的频率为 15 ~ 30 Hz 时,很小的外力即可发生较大的成骨效应^[10]。

力学刺激在骨组织中的转导途径

力学信号在骨骼内的转导通过 4 个阶段,即力学耦联、生化耦联、信号传递和效应细胞反应,将作用在骨骼上的应力信号转导为生物化学信号。骨骼细胞中的转导途径有:细胞膜离子通道(特别是牵拉激活的阳离子选择性通道)、与 G 蛋白耦联的磷脂酶 C 通路、细胞内钙离子和整合素-细胞骨架等^[11]。

有研究证实,整合素-细胞骨架复合体是主要的力学信号转导位点^[11]。细胞骨架属于细胞器,是真核细胞的重要组成部分,与细胞质膜上的蛋白质脂质分子相联结而成为细胞运动、细胞形态和跨膜信号转导的分子基础;整合素是发挥信号受体作用的异源二聚体跨膜蛋白,在胞外通过识别包含 RGD(-Arg-Gly-Asp-)序列的多肽位点与基质蛋白相作用,在胞内粘附斑处通过接头蛋白与肌动蛋白相连,构成整合素-细胞骨架复合体。细胞在力学刺激的作用下发生变形时,可通过细胞外基质和整合素引起细胞骨架成分重组和驱动信号转导。

又有学者提出,细胞的变形不足以被感受,骨组织之所以对力学环境有很强的适应性,是因为骨组织中存在力学调控系统(mechanostat)^[4]。在力学调控系统中,主要的控制因素是肌肉收缩时产生的外力,外力的作用引起骨组织发生应变是力学刺激转导的第一步。在生理状态下,骨应变仅为 0.1%,不足以对骨细胞产生足够的影响,但可引起骨组织中窝-管系统的小管液流动,骨小管中的液流剪切力可能是细胞感受到的主要刺激。骨细胞被认为是感受液流剪切力的生物感受器。当骨受到外力作用时产生应变,引起骨小管内液流动而产生的剪切力被骨细胞感受后,细胞内部可发生一连串的生物化学反应,合成生物化学信号指令,传递给成骨细胞和破骨细胞等主要效应细胞,激活骨重建等生物调控机制^[12]。因此,骨组织中存在的骨细胞-骨小管三维立体网状结构是力学调控系统中的重要组成部分,它不仅是产生和感受液流剪切力的基础,而且作为骨细胞生物化学

信号耦联的结构,可能通过细胞间隙连接(gap junction)来传递信息。

间隙连接是两个细胞或两个细胞的突触相连组成的跨膜通道,其成分主要为连接蛋白(connexin,Cx),允许 Ca^{2+} 、肌醇磷脂等小于 1 kDa 的小分子通过。在骨细胞-骨小管三维立体网状结构中,间隙连接可能是必不可少的结构和功能单位,其主要的连接蛋白是 Cx43。有研究发现,机械应力可使 Cx43 重新分布、间隙连接开放、Cx43 表达增加,且 Cx43 的表达与碱性磷酸酶(alkaline phosphate, AKP)、骨钙素(osteocalcin)的分泌相平行^[13]。可见 Cx43 的表达与细胞的分化密切相关。但间隙连接如何耦联生物化学信号、生物化学信号的成分及其转导机制目前尚不清楚,一些实验结果显示,这可能与 PGE、NO 和胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)等有关^[14]。

生物化学信号及其转导

一、PGE₂

目前,通过骨细胞培养或从骨中提取的 PG 有 PGE₁、PGE₂ 和 PGE₂α, PGE₂ 是骨内花生四烯酸的代谢产物。离体和在体实验均证实, PGE₂ 是转导力学刺激的重要生物化学信号分子之一^[15]。Thorson 等^[16]首次应用微透析技术分析了机械应力对人体 PGE₂ 产生的影响:于局部麻醉后将标准微分析导管插入健康女性胫骨干骺端,休息 2 h 后嘱受试者足跟用力着地,每秒 1 次,总运动时间 5 min,运动开始后每 15 min 取样,连续取 8 次。结果 1 h 后负载组 PGE₂ 水平达实验前的 2.5~3.5 倍($P < 0.05$),不进行运动的对照组 PGE₂ 水平无变化。一般情况下,骨组织受到的外力是系统牵拉、压缩和剪切力的综合作用,但只有液流剪切力能被骨细胞感受并引起 PGE₂ 的分泌^[15,17]。Qiao 等^[15]在 0.12 mN/cm² 的剪切应力作用下培养并分离鼠的成骨样细胞,10 min 后 PGE₂ 合成增加($P < 0.01$),60 min 后 PGE₂ 合成增加效应达最大。Smalt 等^[17]在聚苯乙烯胶片上孵育大鼠的颅骨细胞、长骨细胞、MC3T3-E1、UMR-106-01 及 Ros17/2.8 细胞,给予单向线性应变(500~5 000 μe)后,无 PGE₂ 和 NO 产生,但将成骨细胞暴露在增加的液流环境下可诱导 PGE₂ 和 NO 的产生,作者认为机械负荷是通过液流介导的剪切应力被成骨细胞所感受而引起 PGE₂ 的分泌。

液流剪切力可能通过促进机械敏感性离子通道与 Ca^{2+} 结合及 IP₃ 诱导的 Ca^{2+} 从细胞内钙库释放来提高 Ca^{2+} 浓度, Ca^{2+} 和蛋白激酶 C 可激活磷脂酶 A₂, 产生花生四烯酸,引起 PGE₂ 的释放。在体外,分离的鸡骨细胞经 10 min、(0.70 ± 0.03) Pa、5 Hz 的搏动液流(pulsating fluid flow, PFF)灌注后, PGE₂ 释放增加;而 Ca^{2+} 阻滞剂进入细胞,或细胞内部 Ca^{2+} 的释放则可显著抑制 PFF 诱导的 PGE₂ 的分泌;由 Ca^{2+} 激活的磷脂酶 C、磷脂酶 A₂ 和蛋白激酶 C 的特异性抑制剂也能抑制 PGE₂ 的释放^[18]。另有研究显示,成骨细胞的机械敏感性离子通道可受细胞本身机械负荷的调整^[19]。

PGE₂ 可通过磷脂酰肌醇途径^[20]和 cAMP-PKA 途径^[21]来促进骨形成。Kaneki 等^[20]用 PGE₂ 处理成年大鼠颅盖骨分离的成骨样细胞,发现 AKP 的活性呈剂量依赖性增高,胶原合成和钙化结节形成增加,同时³H 胸腺嘧啶核苷酸掺入细胞减少,胞内 cAMP 提高;而用腺嘌呤循环激活素(forskolin)处理细

胞后,虽然胞内 cAMP 提高,但 AKP 活性降低,胶原合成和钙化结节形成减少;同时发现 PGE₂ 和 forskolin 诱导的胞内 cAMP 均在诱导后 5 min 达峰值,随后 PGE₂ 诱导的 cAMP 迅速降低,40 min 后恢复到基础水平,而 forskolin 诱导的 cAMP 则缓慢下降,60 min 时仍达最高水平的 70%,提示 cAMP 可抑制而不是促进成年大鼠颅盖骨细胞的分化, PGE₂ 可同时激活腺嘌呤循环和磷酸二酯酶;该研究还显示磷酸二酯酶的激活与钙调蛋白有关, PGE₂ 还可引起胞内 Ca^{2+} 浓度和 IP₃ 升高,提示钙调蛋白依赖性激酶与 PGE₂ 诱导的颅骨分化有关,因此 PGE₂ 可能通过激活磷酸肌醇而非腺嘌呤循环来提高 Ca^{2+} 浓度,从而抑制成骨细胞增殖,刺激其分化。由此可见, Ca^{2+} 、IP₃ 似乎与 PGE₂ 的释放及其作用的发挥都有关,但其确切的机制尚不清楚。Nauman 等^[21]认为, PGE₂ 可活化 G 蛋白,激活腺苷酸环化酶,引起 cAMP 聚集,通过促进 DNA 的合成来促进骨形成。还有研究显示, PGE₂ 可上调 BMP₇ 的表达,提高骨内钙化组织及骨细胞内钙的含量、加快骨愈合速度、调节 DNA 的合成^[22,23]。最近的研究显示, PGE₂ 可借助 EP₄ 受体通过自分泌作用促进骨髓基质细胞选择性地定向成骨细胞分化^[24]。

上述结果表明 PGE₂ 在力学刺激转导途径中起着重要作用,但均为短期研究,其长期效果还不太肯定。一项研究发现^[21]:(0.6 ± 0.5) Pa、3.0 Hz 的搏动液流剪切力可使骨细胞分泌的 PGE₂ 提高 4 倍,随后把细胞分为 3 组,分别经过 7 d 的静止培养,低水平(0.06 ± 0.05 Pa、0.3 Hz)和高水平(0.6 ± 0.5 Pa、3.0 Hz)的搏动液流剪切力作用后,骨细胞数量平均提高 83%,组间差异无统计学意义($P > 0.05$);静止培养组的细胞碱性磷酸酶活性降低,而低、高水平搏动液流剪切力组无变化,钙化作用也未受到不同水平剪切力的影响。该结果提示,搏动液流引起的 PGE₂ 短期变化与骨细胞长期增殖或骨基质钙化无关。有研究显示,机械应变引起的骨细胞后期的变化可能与 Egr-1、NF-Kappa B 的激活有部分关系,牵涉到 MAPKs 和 src-Kinases 途径^[25]。

二、NO

NO 是骨的重要生物化学信号分子之一,其合成和作用与一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)密不可分。在生理情况下,免疫组织化学方法在正常骨中仅可检测到 cNOS,而 RT-PCR 技术可检测到 3 种 NOS 异构体转录产物。cNOS 是成年骨和骨源性细胞主要表达的异构体,由其产生的少量 NO 对维持成骨细胞和破骨细胞的正常功能是必需的。骨细胞、成骨细胞、破骨细胞均能生成 NO,而在骨细胞和成骨细胞生成 NO 的过程中,机械应力是重要的调节因素。

Watanuki 等^[26]采用尾部悬吊模型小鼠进行基因敲除,研究了 NO 在力学刺激调节骨代谢中的作用。尾部悬吊 7 d 的 iNOS +/+、iNOS +/- 和 iNOS -/- 型小鼠胫骨近端的骨量(bone volume)和骨形成率降低,破骨细胞表面(osteoclast surface)提高,成骨细胞变扁;重新负重 14 d 后, iNOS +/+、iNOS +/- 型小鼠骨量和骨形成率增加,破骨细胞表面减少。免疫组织化学方法分析发现, iNOS +/+、iNOS +/- 型小鼠成骨细胞及骨细胞中发生了免疫反应;而 iNOS -/- 型小鼠缺乏免疫反应,但经硝酸甘油(NO 的供体)处理后也会出现该反应;相反, iNOS +/+ 型鼠经氨基胍(选择性抑制 iNOS)处理后,免疫反应明显受抑制。骨髓基质细胞培养中, iNOS -/- 型小鼠重新负重后钙化

结节显著减小。该研究结果提示, NO 在尾部悬吊模型动物重新负重后, 对急性期调节骨转换和提高成骨活性起着关键作用。Chow^[14] 分别用 SNAP (S-nitroso-N-acetyl-D-L-penicillamine, NO 的供体) 和 GSNO (S-nitroso-glutathione, NO 供体) 处理鼠第 8 颈椎后, 出现显著的成骨效应, 但如未负重动物骨组织以 SNAP 或 GSNO 处理则不影响其 BFR, 作者认为 NO 是诱导骨形成所必需的信号, 但仅有 NO 是不够的, 必须有力学刺激作用。

力学刺激是骨细胞和成骨细胞生成 NO 的主要调节因素。目前认为, 液流剪切力可通过 2 条不同的生化途径诱导 NO 释放^[27]: 其一是钙依赖途径, 参与液流初始阶段的 NO 释放, G 蛋白参与这一过程, 并可通过激活磷酸酰肌醇途径提高细胞内 Ca^{2+} 水平, 进而活化 cNOS, 诱导 NO 释放; 其二是非钙途径, 由稳定、持续的液流刺激所致, 同时也可引起受 NO 诱导的 PG 释放。

因此, PGE₂ 和 NO 是力学刺激对骨组织影响的重要生物信号, 在机械应力诱导骨形成过程中是必需的^[18], 但它们之间的关系尚不明确。有研究发现, 抑制 NO 的产生可抵消液流刺激引起的 PGE₂ 释放, PG 被认为受到 NO 的调控^[18]。但 Chow^[14] 发现, 动物负重时可抑制 PG 或 NO 的产生, 并部分抑制 c-fos mRNA 的表达; 同时应用消炎痛和 NG-monomethyl-L-arginine (抑制 iNOS 和 cNOS) 则可显著抑制 c-fos 的表达, 说明机械应力对 PG 和 NO 的诱导是彼此独立的, 其作用及机制尚需更深入的研究。

小 结

综上所述, 力学刺激信号可能由多条途径转导, 各途径之间可互相影响。某些活性物质的自身调节和反馈机制的参与, 形成了一个复杂的网状细胞信号转导途径, 其具体的作用途径及转导机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- Donahue SW, Jacobs CR, Donahue HJ. Flow-induced calcium oscillations in rat osteoblasts are age, loading frequency, and shear stress dependent. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281:1635-1641.
- Meyer U, Terodde M, Joosse U, et al. Mechanical stimulation of osteoblasts in cell cultures. *Mun Kiefer Gesichtschir*, 2001, 5:166-172.
- 唐丽灵, 王远亮, 谷俐, 等. 不同应变水平拉伸对成骨细胞生理功能的影响. *重庆大学学报*, 2003, 26:67-70.
- Torstveit MK. Bone adaptation to mechanical loading. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2002, 122:2109-2111.
- Clinton RA, Simon T, Steven B, et al. Low mechanical signals strengthen long bones. *Nature*, 2001, 412:603-604.
- 江建明, 狄勋元, 张跃旋. 骨折段微细运动对长骨干骨折愈合的影响系列研究: 形态学观察. *中华骨科杂志*, 1996, 16:249-252.
- 江建明, 孙炜, 吴一民, 等. 低频振动下成人成骨细胞动力学响应的研究. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24:613-616.
- Robling AG, Hinant FM, Burr DB, et al. Improved bone structure and strength after long-term mechanical loading is greatest if loading is separated into short bouts. *J Bone Miner Res*, 2002, 17:1545-1554.
- Srinivasan S, Weimer DA, Agans SC, et al. Low-magnitude mechanical loading becomes osteogenic when rest is inserted between each load cycle. *J Bone Miner Res*, 2002, 17:1613-1620.
- 林清涛, 宋亦军, 孙允高. 雌激素对肌力与骨量间关系的影响. *国外医学内分泌学分册*, 2003, 23:90-92.
- 李彬, 张西正, 张永亮, 等. 骨组织工程中的应力与生长. *国外医学生物医学工程分册*, 2003, 26:129-134.
- Burger EH, Klein NJ. Responses of bone cells to biomechanical force in vitro. *Adv Dent Res*, 1999, 13:93-98.
- 崔燎, 陈槐卿. 骨细胞间隙连接与物理-生物信号传导研究进展. *国外医学生物医学工程分册*, 2003, 26:108-112.
- Chow JW, Fox SW, Lean JM, et al. Role of nitric oxide and prostaglandins in mechanically induced bone formation. *J Bone Miner Res*, 1998, 13:1039-1044.
- 乔鞠, 陈伟辉, 李声伟, 等. 流动剪切力作用下原代大鼠成骨样细胞 PGE₂ 的表达. *华西口腔医学杂志*, 2001, 19:86-88.
- Thorsen K, Kristoffersson AO, Lerner UH, et al. In situ microrodialysis in bone tissue. Stimulation of prostaglandin E2 Release by weight-bearing mechanical loading. *J Clin Invest*, 1996, 98:2446-2449.
- Smalt R, Mitchell FT, Howard RL, et al. Induction of NO and PGE2 in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain. *Am J Physiol*, 1997, 273:751-758.
- Ajubi NE, Klein NJ, Alblas MJ, et al. Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE2 production by cultured osteocytes. *Am J Physiol*, 1999, 276:171-178.
- Davidson RM, Lingenbrink PA, Norton LA. Continuous mechanical loading alters properties of mechano sensitive channels in G292 osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int*, 1996, 59:500-504.
- Kaneki H, Takasugi I, Fujieda M, et al. Prostaglandin E2 stimulates the formation of mineralized bone nodules by a camp-independent mechanism in the culture of adult rat calvarial osteoblasts. *J Cell Biochem*, 1999, 73:36-48.
- Nauman EA, Satcher RL, Keaveny TM, et al. Osteoblasts respond to pulsatile fluid flow with short-term increases in PGE2 but no change in mineralization. *J Appl Physiol*, 2001, 90:1849-1854.
- Keila S, Kelner A, Weinreb M. Systemic prostaglandin E2 increases cancellous bone formation and mass in aging rats and stimulates their bone marrow osteogenic capacity in vivo and vitro. *J Endocrinol*, 2001, 168:131-139.
- Paralkar VM, Grasser WA, Mansolf AI, et al. Regulation of BMP-7 expression by retinoic acid and prostaglandin E2. *J Cell Physiol*, 2002, 190:207-217.
- Miyamoto K, Suzuki H, Yamamoto S, et al. Prostaglandin E2-mediated anabolic effect of a novel inhibitor of phosphodiesterase 4, XT-611, in the in vitro bone marrow culture. *J Bone Miner Res*, 2003, 18:1471-1477.
- Granet C, Boutahar N, Vico L, et al. MAPK and SRC-kinase control EGR-1 and NF-Kappa β inductions by changes in mechanical environment in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284:622-631.
- Watanuki M, Sakai A, Sakata T, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in skeletal adaptation to acute increases in mechanical loading. *J Bone Miner Res*, 2002, 17:1015-1025.
- McAllister TN, Franges JA. Steady and transient fluid shear stress stimulate NO release in osteoblasts through distinct biochemical pathways. *J Bone Miner Res*, 1999, 14:930-936.

(修回日期: 2005-10-20)

(本文编辑: 吴 倩)