

SDF-1 α /CXCR4 信号通路对轴向应力刺激促进骨再生中影响的实验研究



林剑彪¹, 黄国锋¹, 叶文斌¹, 朱聪², 高建廷¹, 刘国浚¹, 江惠祥², 吴本文¹, 丁真奇¹

1. 厦门大学附属东南医院/第九〇九医院骨科 (福建 漳州 363099)

2. 厦门大学医学院 (福建 厦门 361102)

【摘要】 目的 通过轴向应力刺激促进骨再生, 观察基质细胞衍生因子 1 α /趋化因子 CXC 亚族受体 4 (stromal cell-derived-factor-1 α /cysteine X cysteine receptor 4, SDF-1 α /CXCR4) 信号通路变化, 探讨轴向应力刺激促进骨再生的机制。方法 取 72 只雄性新西兰大白兔, 于右后肢胫骨近端内侧制备直径 8 mm 圆形皮质骨缺损并脱蛋白松质骨支架修复模型后, 随机分为 3 组 ($n=24$)。A 组腹腔注射 PBS, B 组术肢给予应力刺激治疗+腹腔注射 PBS, C 组术肢给予应力刺激治疗+腹腔注射 CXCR4 拮抗剂 (AMD3100)。术后 2、4、8、12 周, 摄 X 线片并采用 Lane-Sandhu X 线评分标准评价骨愈合情况, 取标本行 HE 染色观察新生骨组织及支架降解, 免疫组织化学染色观察 VEGF、CXCR4 表达水平; 4、8 周取标本 Western blot 检测 SDF-1 α 及 CXCR4 蛋白表达水平。12 周行 Micro-CT 检查, 计算新生骨体积及新生骨密度。结果 X 线片检查示, 除术后 2 周各组骨缺损区及支架无明显变化外, 4、8 及 12 周时 B 组骨愈合评分均优于 A、C 组 ($P<0.05$)。12 周时 Micro-CT 扫描可见 B 组骨缺损修复、髓腔再通, 新生骨体积及骨密度均高于 A、C 组 ($P<0.05$)。HE 染色显示, 术后 4 周开始 B 组骨再生及支架降解均明显快于 A、C 组。免疫组织化学染色示, 各组 VEGF 及 CXCR4 阳性表达均在 4 周时达峰值; 各时间点 B 组 VEGF 及 CXCR4 表达量均显著高于 A、C 组 ($P<0.05$)。Western blot 检测显示, 4、8 周时 B 组 SDF-1 α 与 CXCR4 表达量均显著高于 A、C 组 ($P<0.05$)。结论 轴向应力刺激促进骨再生可能与其促进骨缺损区组织高表达 SDF-1 α , 激活与其下游调控 BMSCs 募集的 CXCR4 信号有关。

【关键词】 基质细胞衍生因子 1 α ; 趋化因子 CXC 亚族受体 4; BMSCs; 轴向应力; 骨再生; 兔

Effect of stromal cell-derived-factor-1 α /cysteine X cysteine receptor 4 signaling pathway on axial stress stimulation promoting bone regeneration

LIN Jianbiao¹, HUANG Guofeng¹, YE Wenbin¹, ZHU Cong², GAO Jianting¹, LIU Guojun¹, JIANG Huixiang², WU Benwen¹, DING Zhenqi¹

1. Department of Orthopedic, the Affiliated Dongnan Hospital of Xiamen University, the 909th Hospital, Zhangzhou Fujian, 363099, P.R.China

2. School of Medicine, Xiamen University, Xiamen Fujian, 361102, P.R.China

Corresponding authors: HUANG Guofeng, Email: huangguofeng175@163.com; DING Zhenqi, Email: dzqi@xmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To observe the change of stromal cell-derived-factor-1 α /cysteine X cysteine receptor 4 (SDF-1 α /CXCR4) signaling pathway during the process of bone stress stimulation, and to further explore its mechanism. **Methods** A total of 72 New Zealand white male rabbits were selected to prepare the single cortical bone defect in diameter of 8 mm at the proximal end of the right tibia that repaired with deproteinized cancellous bone. All models were randomly divided into 3 groups ($n=24$). Group A was treated with intraperitoneally injection of PBS; Group B was treated with stress stimulation and intraperitoneally injection of PBS; Group C was treated with stress stimulation and intraperitoneally injection of AMD3100 solution. The X-ray films were taken and Lane-Sandhu bone healing score of 3 groups were scored at 2, 4, 8, and 12 weeks after operation, while specimens were harvested for HE staining, immunohistochemical staining of vascular endothelial growth factor (VEGF) and CXCR4, and Western blot (SDF-1 α and CXCR4). The bone healing area was scanned by Micro-CT at 12 weeks after the operation, and the volume and density of new bone were calculated. **Results** X-ray film showed that the Lane-Sandhu scores of bone healing in group B were

DOI: 10.7507/1002-1892.201811031

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81401783); 福建省自然科学基金资助项目 (2016J05208); 军队后勤科研项目基金 (CNJ16C013); 军队青年医学科技培育项目 (19QNP046)

通信作者: 黄国锋, Email: huangguofeng175@163.com; 丁真奇, Email: dzqi@xmu.edu.cn

significantly higher than those in groups A and C at 4, 8, and 12 weeks after operation ($P < 0.05$). Micro-CT scan showed that the bone defect was repaired in group B and the pulp cavity was re-passed at 12 weeks after operation. The volume and density of new bone were higher than those of groups A and C ($P < 0.05$). HE staining showed that the new bone growth in bone defect area and the degradation of scaffolds were faster in group B than in groups A and C after 4 weeks. The immunohistochemical staining showed that the expressions of VEGF and CXCR4 in 3 groups reached the peak at 4 weeks, and the group B was higher than groups A and C ($P < 0.05$). Western blot analysis showed that the expressions of SDF-1 α and CXCR4 in group B were significantly higher than those in groups A and C at 4 and 8 weeks after operation ($P < 0.05$). **Conclusion** Axial stress stimulation can promote the expression of SDF-1 α in bone defect tissue, activate and regulate the CXCR4 signal collected by marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), and accelerate bone regeneration in defect area.

【Key words】 Stromal cell-derived-factor-1 α ; cysteine X cysteine receptor 4; marrow mesenchymal stem cells; axial stress; bone regeneration; rabbit

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81401783); Natural Science Foundation of Fujian Province (2016J05208); Military Logistics Scientific Research Project Foundation (CNJ16C013); Military Youth Medical Science and Technology Training Project (19QNP046)

力学环境是骨生长与骨重建过程中的重要微环境之一, 同样也是 BMSCs 增殖与分化过程中关键的刺激因素^[1]。BMSCs 是骨髓内一种具有多向分化潜能的干细胞, 机体受损时其能在受伤组织细胞分泌的趋化因子影响下, 迁移到骨折区域或骨缺损处, 促进骨愈合^[2-3]。研究表明, 基质细胞衍生因子 1 α /趋化因子 CXC 亚族受体 4 (stromal cell-derived-factor-1 α /cysteine X cysteine receptor 4, SDF-1 α /CXCR4) 信号通路在 MSCs 迁移中发挥重要作用^[4]。然而, SDF-1 α /CXCR4 信号通路是否在轴向应力刺激促进骨再生中发挥作用, 目前尚不明确。相关研究已经证实轴向应力刺激可加速骨折愈合^[5-8]及支架降解^[9], 但具体机制尚不明确。

本课题组主要以轴向应力刺激为中心, 将脱蛋白松质骨、BMSCs 及 SDF-1 α /CXCR4 信号通路的研究相结合, 以明确外界刺激与内部调节因子间的关系。本研究利用自行研制的骨应力激叩击仪进行动物实验, 通过制备兔胫骨缺损修复模型模拟人体骨缺损骨修复过程, 修复期间行轴向叩击治疗, 经影像学、免疫组织化学及 Western blot 检测, 了解骨愈合情况以及 VEGF、SDF-1 α 和 CXCR4 的表达情况, 进一步探讨轴向应力刺激促进骨再生的机制。报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

3 ~ 4 月龄雄性新西兰大白兔 72 只, 体质量 2.0 ~ 2.5 kg, 由上海市松江区松联实验动物场提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(沪)2012-0011【补充使用许可证号】; 由厦门大学附属东

南医院/第九〇九医院全军骨科中心实验动物房饲养。实验经厦门大学附属东南医院/第九〇九医院动物伦理委员会机构批准, 实验过程对动物的处置严格遵循国家所指定的有关动物保护和指南。

1.2 主要试剂及仪器

CXCR4 拮抗剂 AMD3100 (上海皓元生物医药科技有限公司), 使用前用 PBS 溶液配制成浓度为 0.1 mg/mL 的 AMD3100 溶液。一抗兔/小鼠 IgG、二抗聚合 HRP 标记兔/小鼠 IgG (武汉博士德生物工程技术有限公司); SDF-1 α 、CXCR4 羊抗大鼠多克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司); 羊抗兔 IgG (南京森贝伽生物科技有限公司)。

骨应力刺激仪 (专利号: CN1803117; 福建厦门大博颖精医疗器械公司)。该仪器主要由主机、连接于主机一侧的凹槽式托架及遥控器 3 个部分组成。通过小锤伸缩运动, 给予动态轴向循环应力刺激, 模拟动物活动时负重骨受到的生理性应力。应力范围 1 ~ 50 N, 频率 0.5 ~ 3.0 Hz, 叩击时间 5 ~ 35 s, 间歇时间 3 ~ 19 s。Leo-1530 扫描电镜 (LEO 公司, 德国); Image Pro Plus5.0 图像分析软件 (MEDIA CYBERNETICS 公司, 美国); ChemiScope 6000 Touch 型电泳指导成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司)。

1.3 脱蛋白松质骨支架制备

按照文献[10]方法制备脱蛋白松质骨支架。取市售小牛 (6 ~ 8 月龄) 胫骨【?】, 彻底剔除干骺端后, 玻璃钻钻取直径 8 mm 圆柱状松质骨; 37 $^{\circ}$ C 水浴箱孵育条件下, 将松质骨置入 20% H_2O_2 进行脱蛋白 72 h, 乙醚循环脱脂 48 h, 制备脱蛋白松质骨支架, 冷冻干燥。扫描电镜观察支架内部密集微孔

结构,直径约 200 μm (图 1)。选择微孔密度、大小类似的支架样品,环氧乙烷消毒,密封保存备用。

1.4 动物模型制备

72 只新西兰大白兔术前禁水 2 h、禁食 8 h。将氯胺酮、陆眠宁按 2 : 1 混合后,肌肉注射 (0.5 mL/kg) 麻醉实验动物。于右后肢胫骨平台内侧下方 0.5 cm 处作长 2 cm 的纵切口,分离周围软组织与筋膜,向外牵开韧带,暴露胫骨结节近端斜面,用执笔式电钻制作直径 8 mm 圆形皮质骨缺损^[11]。制备过程中,钻头垂直于骨面,钻取深度为 0.5 ~ 0.8 mm; 注意生理盐水连续冲洗降温,同时清除骨碎屑。生理盐水冲洗术区后,于骨缺损处植入大小适合脱蛋白松质骨支架,纱布擦拭干净后逐层缝合切口。术后每天注射青霉素 40 万 U, 连续 3 d, 预防感染。石膏固定术肢于屈髋、屈膝、屈踝位,直至实验结束。见图 2a ~ c。

1.5 实验分组及方法

将 72 只动物模型随机分为 3 组 ($n=24$), 分别为 PBS 组 (A 组)、PBS+应力刺激组 (B 组)、AMD3100+应力刺激组 (C 组)。骨缺损修复模型制备术后, C 组立即腹腔注射 AMD3100 溶液 (5 mL/kg), 隔天 1 次, 直至实验结束; A、B 组腹腔注射 PBS 溶液 (5 mL/kg)。术后第 8 天开始, B、C 组

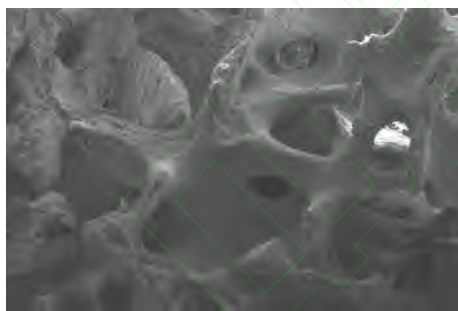


图 1 扫描电镜观察脱蛋白松质骨支架 ($\times 50$)

Fig.1 Scanning electron microscopy observation of deproteinized cancellous bone scaffold ($\times 50$)

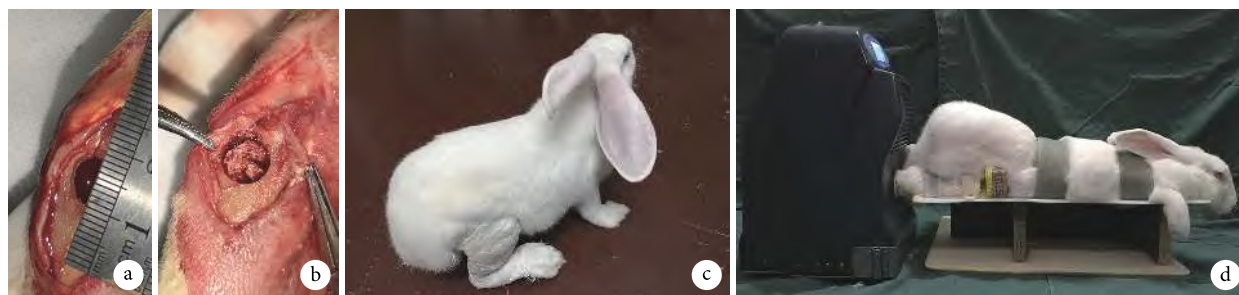


图 2 兔胫骨缺损修复模型制备及术肢应力刺激示意图 a. 修复前; b. 修复后; c. 石膏固定后; d. 术肢给予应力刺激

Fig.2 Repair model of tibial defect in rabbits and stress stimulus sketch of operative limbs a. Before repair; b. After repair; c. After plaster fixation; d. Stress stimulation of the operative limb

采用骨应力刺激仪叩击兔术侧足跟部。叩击前同上法麻醉动物,拆除术肢石膏后将胫骨水平放置于固定架,足跟部与叩击小锤圆心在同一水平面上,小锤通过往返伸缩运动叩击足跟部 (图 2d)。每 2 天给予应力刺激 1 次,每次 30 min,直至实验结束。叩击参数:应力 15 N、频率 1 Hz、叩击时间 5 s、间歇时间 3 s。叩击结束后术肢再次石膏固定,分笼饲养,允许自由活动。

1.6 观测指标

1.6.1 一般情况 观察各组术后动物成活及切口愈合情况,有无其他处骨折导致术肢畸形。

1.6.2 影像学观测 术后 2、4、8、12 周,各组取 6 只动物摄 X 线片,观察骨缺损愈合情况。根据 Lane-Sandhu X 线评分标准^[12],从有无新骨形成、骨折线清晰程度和骨重塑情况三方面对骨愈合评分。术后 12 周,各组 X 线片观察后行 Micro-CT 检查,对骨缺损区域扫描并三维重建,计算新生骨体积及新生骨密度。

1.6.3 组织学观察 术后 2、4、8、12 周,各组影像学观测后采用空气栓塞法处死动物,按照原切口入路切取胫骨,剔除胫骨肌肉组织,在骨缺损区域上、下各 0.25 cm 处用线锯锯断,获得长约 1.5 cm 骨组织。取部分标本脱钙、石蜡包埋、切片,片厚约 3 μm ,常规 HE 染色后,光镜下观察新生骨组织及支架降解情况。

1.6.4 免疫组织化学染色观察 术后 2、4、8、12 周,取各组 1.6.2 中制备的切片脱蜡和水化, PBS 清洗后抗原修复,甲醛固定。滴加一抗兔/小鼠 IgG, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,滴加聚合 HRP 标记抗兔/小鼠 IgG 二抗, DAB 显色,苏木素复染,梯度脱水、透明、树脂封片。光镜下观察骨缺损区、支架、外骨痂及内骨痂骨。采用 Image Pro Plus 5.0 图像分析软件测定 VEGF、CXCR4 阳性细胞吸光度 (A) 值,评价其表达水平。

1.6.5 Western blot 检测 取3组术后4、8周部分骨组织样本,制备电泳凝胶,进行SDS-PAGE及转移(半干式转移)。免疫化学反应一抗为SDF-1 α 、CXCR4羊抗大鼠多克隆抗体(1:500),二抗为羊抗兔IgG(1:5000)。采用电泳指导成像系统对杂交带进行扫膜分析,测量SDF-1 α 及CXCR4蛋白表达水平。

1.7 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件进行分析。数据以均值 \pm 标准差表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用LSD法;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

实验过程中,3只动物因麻醉原因死亡,作相应补充。各组实验动物麻醉清醒后均正常进食,术后切口均I期愈合。术后12周标本取材时大体观察,A组骨缺损区可见大量支架残留,仅有部分新生骨生成;B组骨缺损区支架被新生骨完全吸收替代,髓腔通畅;C组骨缺损区骨痂生成,支架大部分吸收,但骨缺损仍未修复。

2.2 影像学观测

2.2.1 X线片观察 A组:术后2周骨缺损区及支架无明显变化;4周时仅少量骨痂形成,骨缺损边缘仍清晰可见;8周时骨痂增多,但大部分支架仍存在,无明显吸收;12周骨痂进一步增多,但骨缺损区仍以高密度阴影为主,髓腔仍被支架堵塞。B组:术后2周骨缺损区边缘骨折线稍模糊;4周时骨缺损区边缘变模糊,骨痂进一步向支架长入;8周时新生骨痂明显增多,且支架大部分吸收,出现部分骨髓腔结构;12周时骨缺损区新生骨组织形态与正常骨基本相同,新骨塑形好,髓腔再通,骨皮质连续。C组:术后2周骨缺损区及支架无明显变化;4周时骨缺损中央区呈低密度组织阴影,可见少量新生骨痂;8周时骨缺损边缘模糊,部分骨痂形成;12周骨缺损区未愈合,支架大部分吸收。见图3。

X线片评分显示,除2周外,4、8、12周时B组评分均明显高于A、C组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图4。

2.2.2 Micro-CT观测 术后12周,A组胫骨骨缺损仅部分修复,骨痂较少,骨髓腔中仍见大量支架;B组骨缺损完全修复,髓腔再通且修复部位骨皮质厚度较一致;C组骨缺损未完全修复,髓腔中仍有少量支架。见图5。

B组新生骨体积为 $(192.3\pm 9.9)\text{mm}^3$,明显高于A组的 $(88.6\pm 8.0)\text{mm}^3$ 和C组的 $(87.3\pm 10.3)\text{mm}^3$,差异均有统计学意义($P<0.05$);B组新生骨密度为 $(969.2\pm 102.2)\text{mg HA/ccm}$,明显高于A组的 $(627.8\pm 95.3)\text{mg HA/ccm}$ 和C组的 $(605.1\pm 95.4)\text{mg HA/ccm}$,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 组织学观察

A组:术后2周,支架无明显吸收且未见新生骨组织;4周,支架材料无明显吸收,材料孔隙内充满纤维组织及炎性细胞,极少量新生骨形成;8周,支架部分吸收,周围仍为纤维组织包裹,缺损区边缘少量新生骨形成;12周,仍可见大部分支架存在,有部分新骨形成,以缺损区边缘为主,新生骨与宿主部分连接。见图6a。

B组:术后2周,支架材料孔隙内有部分纤维结缔组织、血管和炎性细胞聚集,支架上可见少量新生骨组织;4周,支架材料部分吸收,纤维结缔组织、血管及新生骨组织进一步增多;8周,支架材料大部分吸收,以新生骨组织替代,新生骨与骨端连接紧密;12周,支架完全吸收,部分新生骨形成板层骨,有典型骨小梁形成,内可见大量成骨细胞,缺损区骨皮质连续。见图6b。

C组:术后2周,支架无明显吸收及无新生骨组织;4周,支架少量吸收且可见少量新生骨组织,纤维结缔组织、血管;8周,支架进一步吸收,少量骨小梁,周围分布大量纤维结缔组织、炎性细胞及新生血管;12周,仍可见部分残余支架,骨组织虽呈一定序列排列,骨小梁间间隙宽大且数量较少,未见明显成骨细胞。见图6c。

2.4 免疫组织化学染色观察

2.4.1 VEGF 术后2周,3组基质中间充质细胞、软骨细胞及成纤维细胞中均有VEGF阳性表达。4周,与A、C组相比,B组支架周边及新生骨组织阳性表达均增强。8周,3组VEGF阳性表达较前下降,但B组阳性表达仍高于A、C组。见图7。

2.4.2 CXCR4 术后2周,A组仅有少量细胞显色,B组较多,C组偶有细胞显色。4周,A、B组显色进一步增多,B组显色程度强于A组,且在MSCs可以大面积显色,C组仍仅有少数细胞显色。8周时,3组显色较前减弱,但B组仍强于A、C组。见图8。

术后各时间点B组VEGF、CXCR4阳性表达量明显高于A、C组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图9。

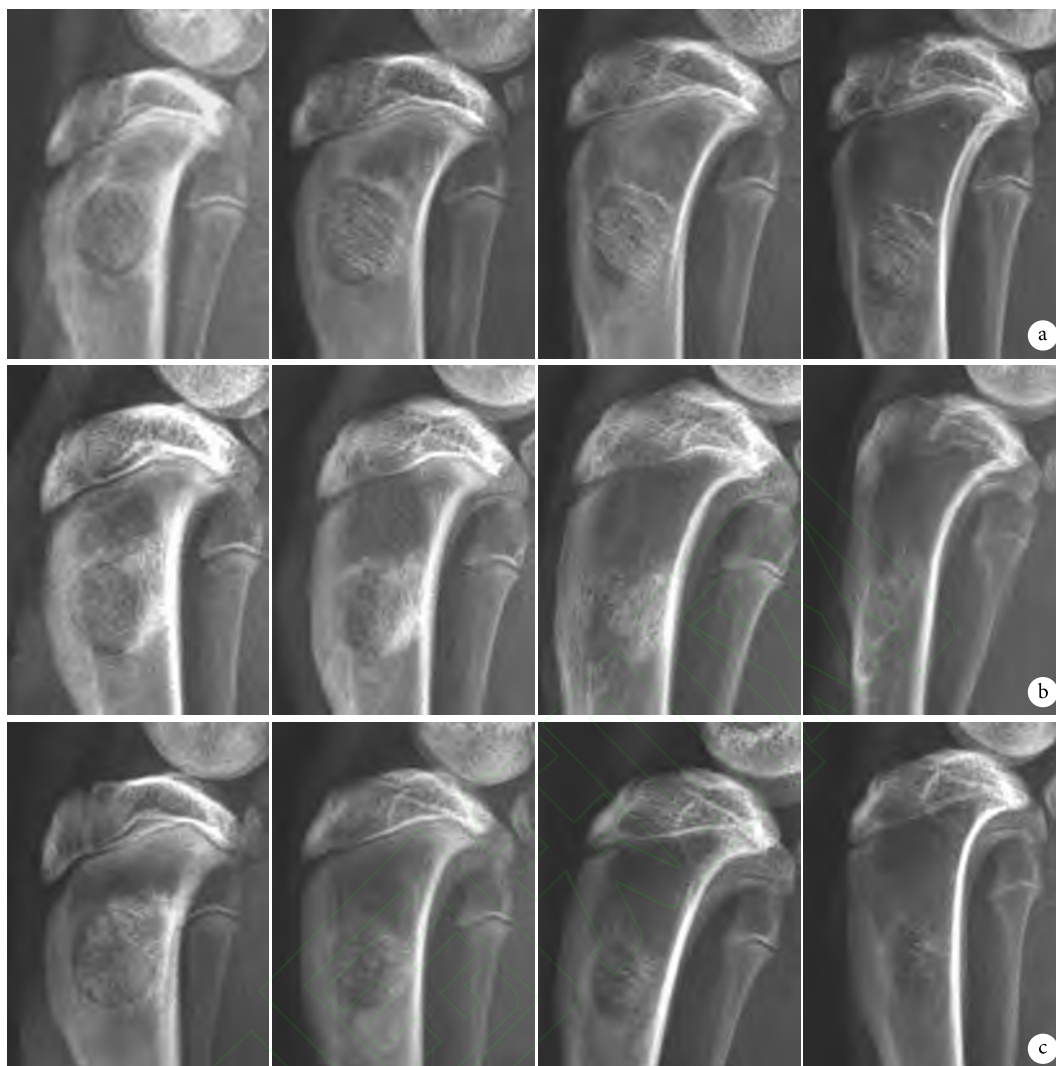


图 3 术后各组 X 线片检查 从左至右分别为 2、4、8、12 周 a. A 组; b. B 组; c. C 组

Fig.3 X-ray films of 3 groups after operation From left to right for 2, 4, 8, and 12 weeks, respectively a. Group A; b. Group B; c. Group C

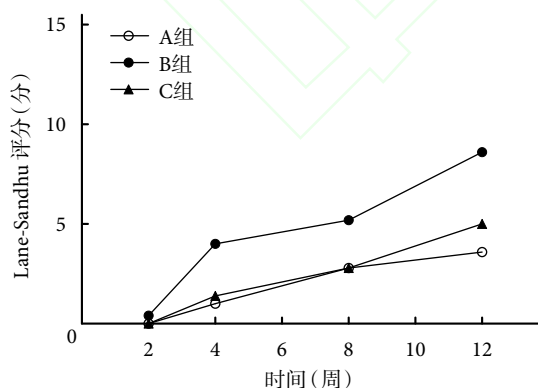


图 4 术后各组 Lane-Sandhu X 线片评分

Fig.4 The Lane-Sandhu scores of 3 groups after operation

2.5 Western blot 检测

4、8 周时 B 组 SDF-1 α 与 CXCR4 蛋白表达均高于 A、C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 10、11。

3 讨论

骨折愈合是一个错综复杂的生物学过程, 与应力环境密切相关。应力对骨折愈合的影响主要包括 3 个因素。① 应力方向: 骨折愈合初期, 轴向应力可促进软骨基质矿化及 BMSCs 分化、增殖, 并形成不同的组织类型, 有利于编织骨改建成板层骨^[13-14]。临床研究已经证实轴向应力叩击治疗明显加速骨再生, 促进骨愈合, 具有良好的临床应用价值^[6]。② 应力方式: 与连续性应力刺激相比, 间歇性应力刺激更能增强成骨细胞活性。喻鑫罡等^[15]对绵羊双侧胫骨中段横行截骨, 在单边外固定支架固定后予低频微动刺激, 显示频率 1.0 Hz 的微动刺激在骨折愈合早期能有效促进骨组织生长及骨痂矿化。③ 应力大小: 应力刺激过大、过小均不利于骨折愈合, 只有适宜的应力才能促进成骨作用。本课题组前期研究^[9]还发现, 术后 1 周给予兔自身体

质量 1/2 的应力叩击最有利于骨缺损修复, 轴向应力刺激最佳参数组合为每 2 天刺激 1 次, 每次 30 min, 应力参数 15 N, 频率 1 Hz, 叩击时间 5 s, 间歇时间 3 s, 有利于成骨的最终形成及支架材料

降解。因此, 本次研究中我们选择了该应力参数组合, 结果显示该种叩击式应力刺激同样可以促进骨再生。

本次研究一个重要目的是探索叩击式应力刺

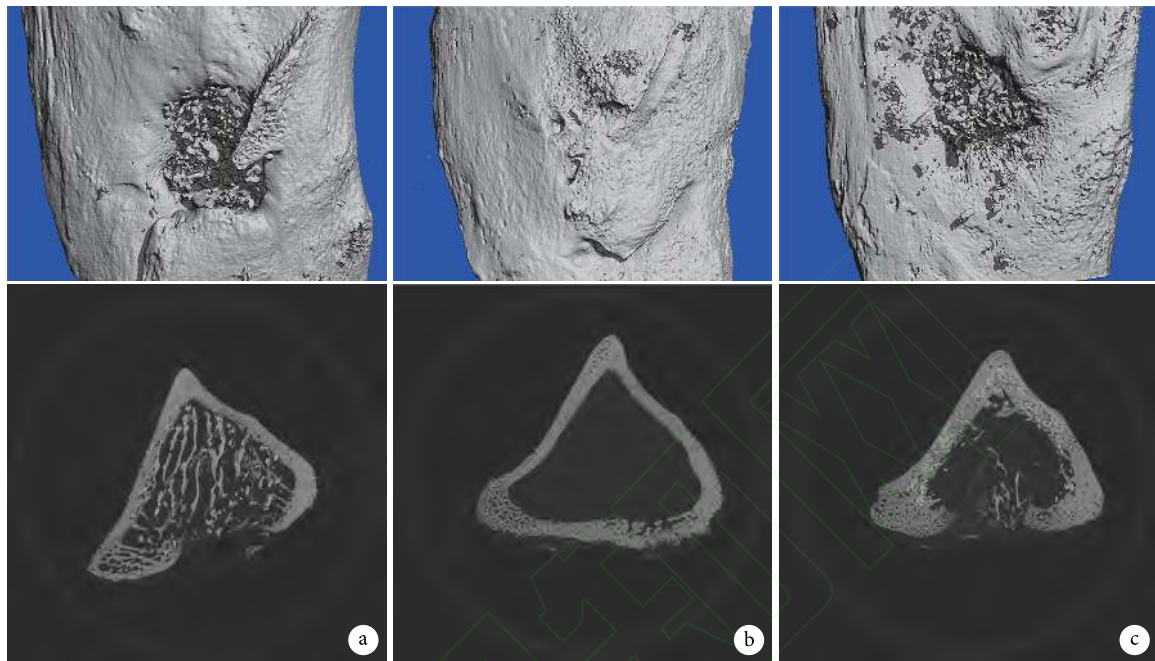


图 5 各组术后 12 周骨缺损区域 Micro CT 三维重建 a. A 组; b. B 组; c. C 组

Fig.5 Micro-CT three-dimensional reconstruction of bone defect at 12 weeks after operation in 3 groups a. Group A; b. Group B; c. Group C

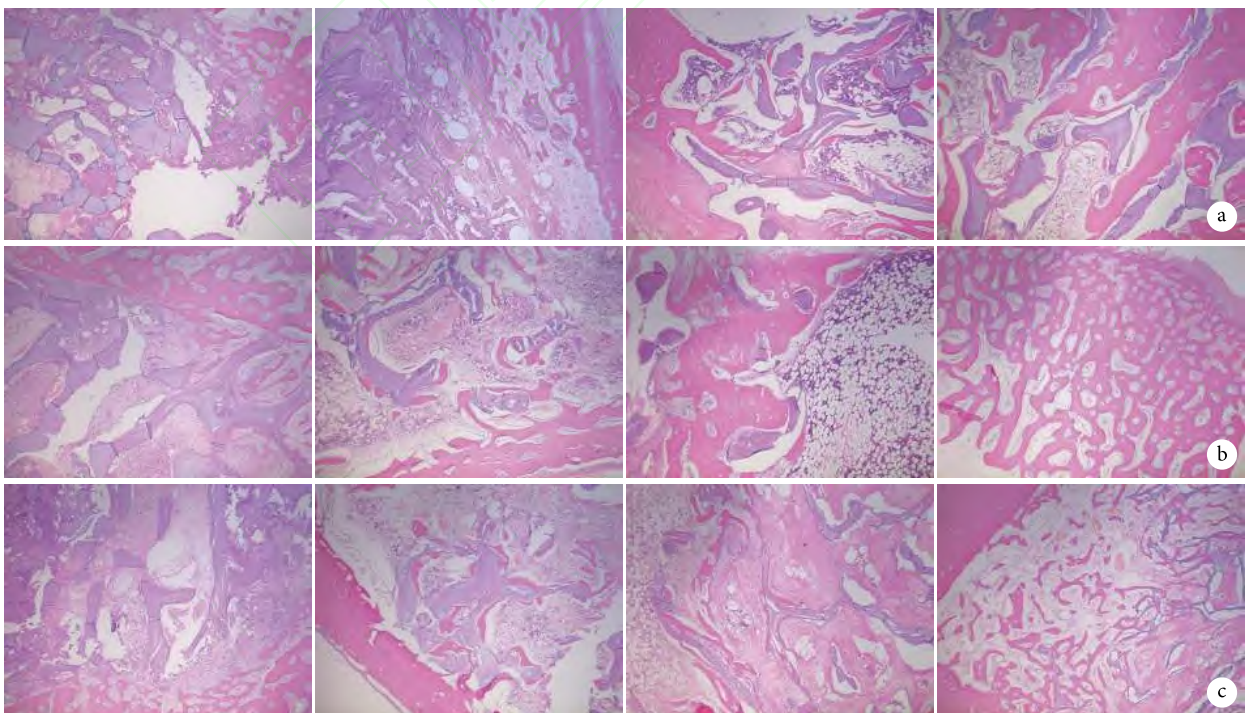


图 6 术后各组 HE 染色观察 (×40) 从左至右分别为 2、4、8、12 周 a. A 组; b. B 组; c. C 组

Fig.6 HE staining observation of 3 groups after operation (×40) From left to right for 2, 4, 8, and 12 weeks, respectively a. Group A; b. Group B; c. Group C

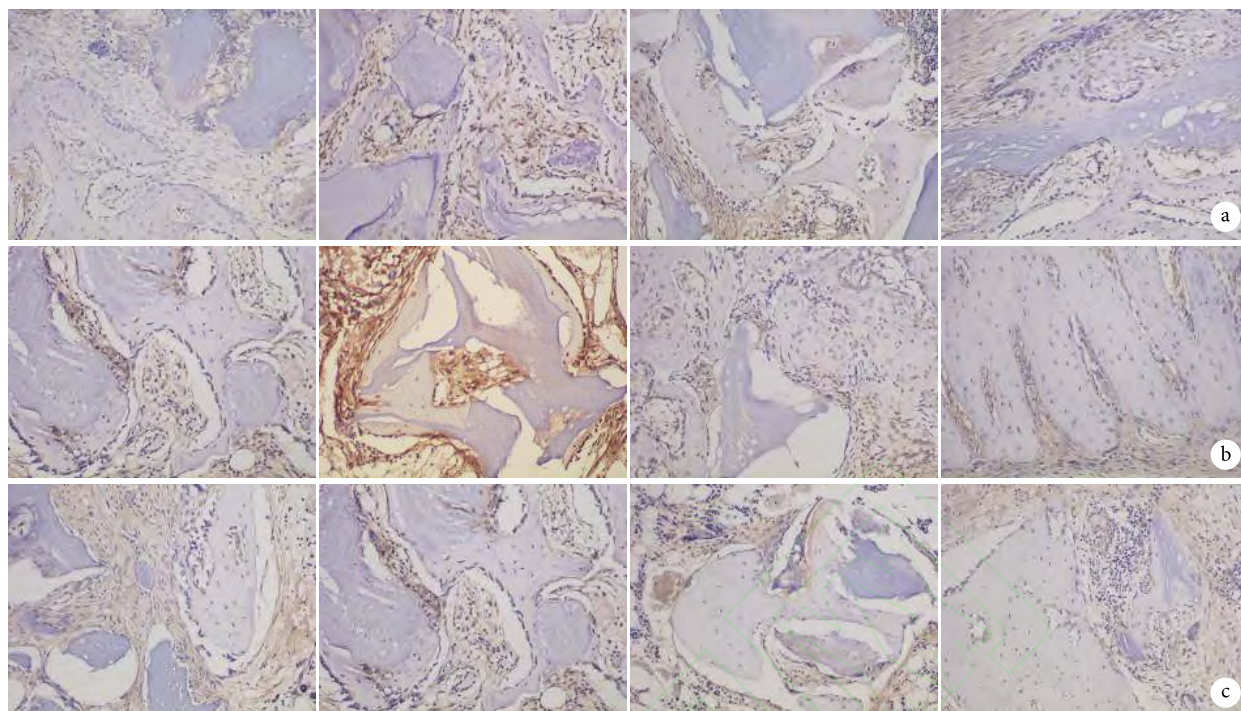


图 7 术后各组免疫组织化学染色观察 VEGF 表达 (×200) 从左至右分别为 2、4、8、12 周 a. A 组; b. B 组; c. C 组

Fig.7 Immunohistochemical staining of VEGF observation in 3 groups after operation (×200) From left to right for 2, 4, 8, and 12 weeks, respectively a. Group A; b. Group B; c. Group C

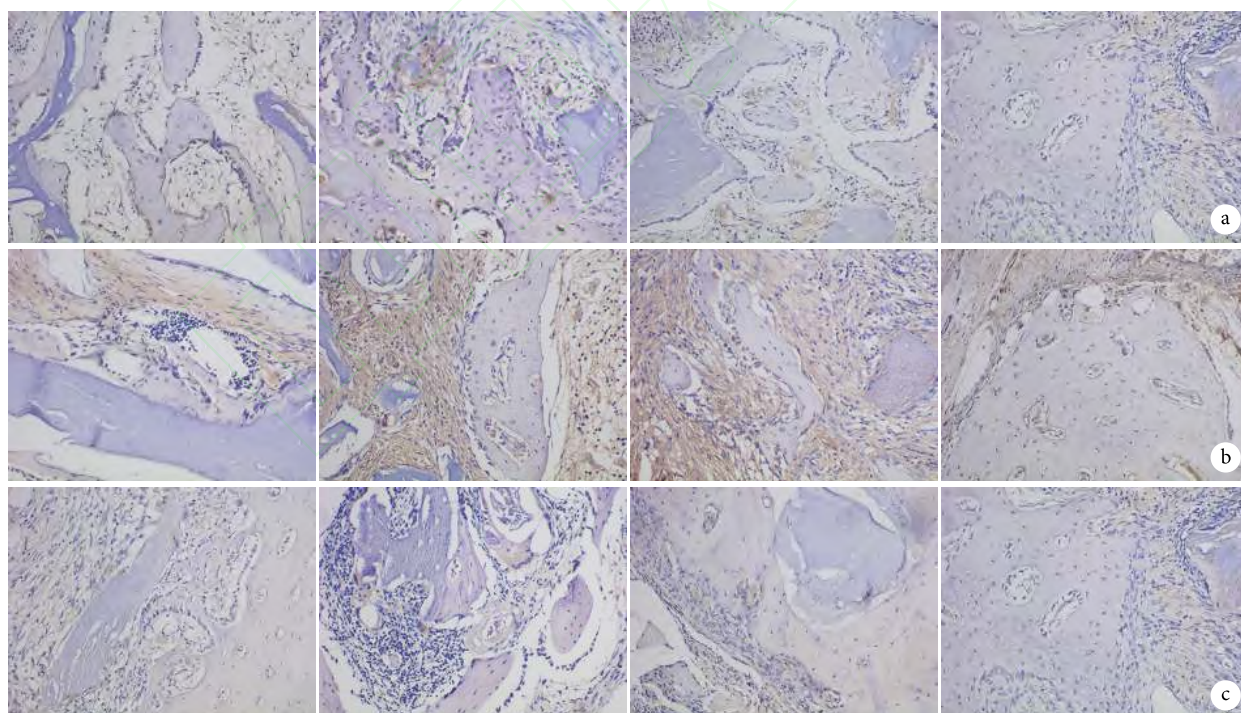


图 8 各时间点各组免疫组织化学染色观察 CXCR4 表达 (×200) 从左至右分别为 2、4、8、12 周 a. A 组; b. B 组; c. C 组

Fig.8 Immunohistochemical staining of CXCR4 observation in 3 groups after operation (×200) From left to right for 2, 4, 8, and 12 weeks, respectively a. Group A; b. Group B; c. Group C

激促进骨再生的机制。既往研究发现, SDF-1 α 在机械应力刺激骨折愈合的过程中起重要作用。人体内 SDF-1 α /CXCR4 是 BMSCs 动员、迁移、归巢的

关键性因素之一。同时, 在骨损伤早期时, 各种炎性介质亦能调节 SDF-1 α 表达, 相关动物实验发现通过给予间歇性应力刺激, 在一定程度上造成细微

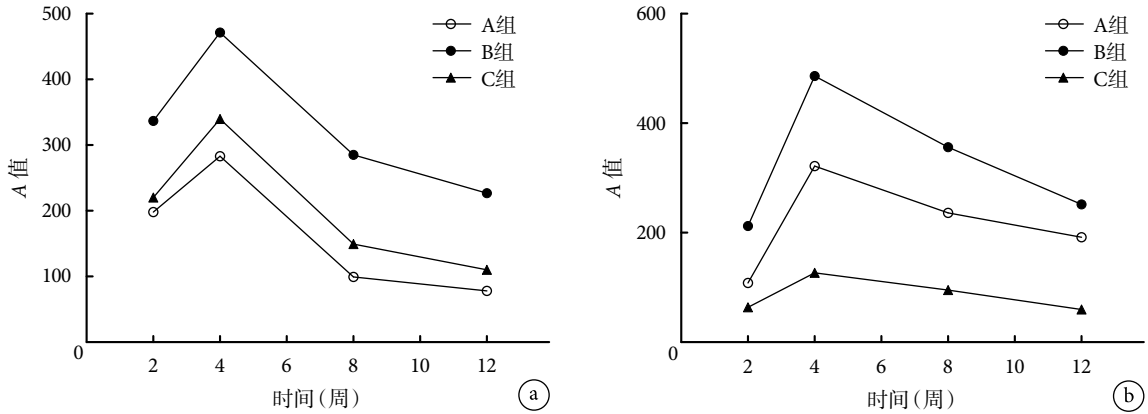


图9 各组 VEGF 及 CXCR4 表达量比较 a. VEGF; b. CXCR4

Fig.9 Comparison of expressions of VEGF and CXCR4 between groups a. VEGF; b. CXCR4

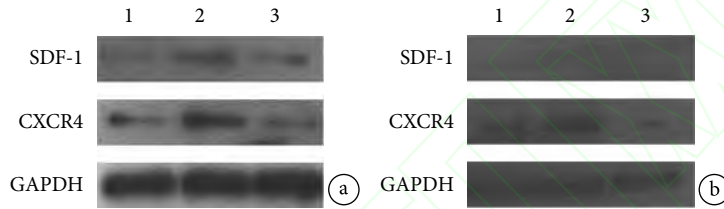


图10 Western blot 观察 SDF-1α 及 CXCR4 蛋白表达 a. 4 周; b. 8 周

Fig.10 Western blot observation of SDF-1α and CXCR4 protein expressions a. Four weeks; b. Eight weeks

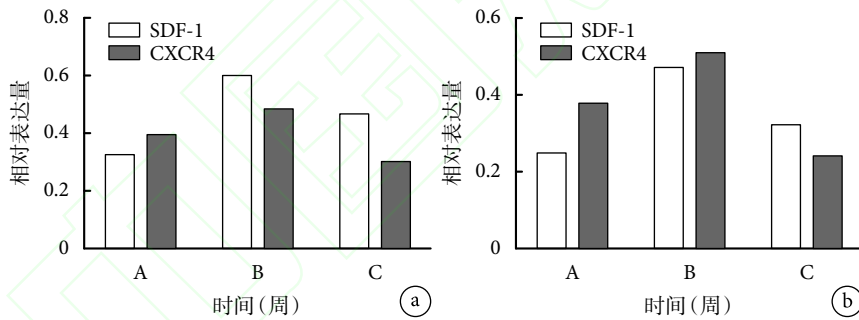


图11 各组 SDF-1α 及 CXCR4 蛋白表达量比较

Fig.11 Comparison of SDF-1α and CXCR4 protein expressions between groups

的二次损伤,可明显延长骨折区域的炎症反应期^[16],使骨膜表达 SDF-1α 明显增强,诱导 BMSCs 迁移至骨损伤部位^[17]。BMSCs 进入骨缺损区域后,不但可以分泌促进新生骨组织细胞生长因子,还可以间接促进骨组织血管化,对于加速骨愈合形成起着重要作用^[18-19]。另外, BMSCs 增殖与分化过程中离不开机械应力刺激^[1]。Simmons 等^[20]采用周期性机械牵张力刺激 BMSCs,研究发现实验组细胞外基质矿化明显优于对照组。而缺乏机械应力刺激时, BMSCs 向脂肪细胞转化的能力增强,向成骨细胞转化的能力受到抑制。

为进一步验证 SDF-1α/CXCR4 信号通路的作用,我们采用了 AMD3100 阻断 SDF-1α/CXCR4 信

号通路,观察骨再生是否受影响。本次研究所用的 AMD3100 是人工合成的大环类 CXCR4 的非肽类阻断剂,可有效地与 CXCR4 结合阻断 SDF-1α 与 CXCR4 启动下游信号通路,但不产生激动作用。AMD3100 具有阻止 BMSCs 顺 SDF-1α 浓度梯度迁移的作用,大剂量 AMD3100 具备动员干细胞作用,而小剂量 AMD3100 动员干细胞能力明显减弱。有研究发现 SDF-1α 能刺激 VEGF、TGF-β 的表达^[21-23],利用鼠模型研究 VEGF 诱导血管形成,发现新生血管周围聚集着 BMSCs,同时 SDF-1α 大量表达,当给予 AMD3100 阻断信号通路后 BMSCs 和新生血管数量明显减少,提示 VEGF 能够诱导 BMSCs,且 SDF-1α 能协助 VEGF 促血管形成,两者

具有相互影响、协同分泌作用。本次研究中,相同应力刺激下连续应用小剂量 AMD3100 使骨折愈合时间明显延长,提示 SDF-1 α /CXCR4 信号轴在轴向应力促进骨再生中发挥重要调节作用。另外,本次研究观察了术后 2、4、8、12 周骨缺损区移植支架吸收与骨愈合情况,分析早期应力刺激状态下骨愈合与 SDF-1 α 的相关性。研究表明,仅有胞膜表达 CXCR4 的 BMSCs 才会顺 SDF-1 α 浓度差迁移至骨折部位,无 CXCR4 的 BMSCs 则不受诱导^[24]。本次研究中, CXCR4 免疫组织化学染色观察发现, B 组在术后染色程度强于 A、C 组, A 组显色弱于 B 组,而 C 组仅微量表达。这提示骨愈合早期,应力刺激可能延长炎症期,骨缺损区组织 SDF-1 α 表达得到加强,轴向应力叩击同时促使 BMSCs 不断增殖、分化,成骨细胞和软骨细胞数量剧增,形成放大效应,骨愈合后期骨损伤处逐渐修复, SDF-1 α 表达减少,阳性结果表达呈递减趋势。同时, Western blot 检测结果显示,应力刺激下 SDF-1 α 及 CXCR4 在骨愈合早期得到充分表达,随着骨缺损区的修复,受损组织局部氧张力趋于正常, SDF-1 α 表达量逐渐下降,亦接近于正常^[25],此与免疫组织化学染色结果一致。上述结果表明,给予应力刺激下,骨损伤组织 SDF-1 α 蛋白表达明显增多,表达有 CXCR4 受体的 BMSCs 数量随之增多,反之说明若缺少应力刺激可能会影响 BMSCs 增殖及分化进程。

本研究存在不足之处,比如未阐明应力刺激治疗后,骨缺损 SDF-1 α 表达上调的具体分泌组织结构、检测诱导 BMSCs 的 SDF-1 α 最佳浓度,未能验证除此因素是否还受其他生长因子的调控。普遍认为 SDF-1 α 仅有唯一受体 CXCR4^[26],但随着研究深入,发现 CXCR7 为 SDF-1 α 新受体^[27]。虽然 AMD3100 能够同时抑制 BMSCs 膜上 CXCR4 及 CXCR7 蛋白的表达^[28],但对 SDF-1 α /CXCR7 信号通路在 BMSCs 中的作用机制有待进一步探索。

参考文献

- Hwang SJ, Lublinsky S, Seo YK, *et al.* Extremely small-magnitude accelerations enhance bone regeneration: a preliminary study. *Clin Orthop Relat Res*, 2009, 467(4): 1083-1091.
- Zhang F, Tsai S, Kato K, *et al.* Transforming growth factor-beta promotes recruitment of bone marrow cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells through stimulation of MCP-1 production in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 2009, 284(26): 17564-17574.
- Rollin R, Alvarezlafuente R, Marco F, *et al.* Abnormal transforming growth factor-beta expression in mesenchymal stem cells from patients with osteoarthritis. *J Rheumatol*, 2008, 35(5): 904-906.
- Mendelson A, Cheung Yk, Paluch K, *et al.* Competitive stem cell recruitment by multiple cytotactic cues. *Lab Chip*, 2013, 13(6): 1156-1164.
- 张峰, 王江泽, 丁真奇, 等. 叩击式骨应力刺激仪促进山羊胫骨骨折愈合的实验研究. *中华创伤骨科杂志*, 2016, 18(1): 66-73.
- 陈德旺, 丁真奇, 翟文亮, 等. 骨应力刺激仪叩击治疗促进小腿骨干骨折术后骨愈合的前瞻性研究. *中华创伤骨科杂志*, 2012, 14(4): 304-308.
- 卢庆威, 万春友, 张毅, 等. 轴向载荷力学测试在胫腓骨骨折术后外固定器拆除中的临床应用. *中国修复重建外科杂志*, 2016, 30(9): 1085-1088.
- 葛启航, 万春友, 刘亚北, 等. 胫腓骨开放骨折 Taylor 空间支架外固定术后轴向应力刺激对骨折愈合的影响研究. *中国修复重建外科杂志*, 2017, 31(8): 931-935.
- 刘国凌, 黄国锋, 高建廷, 等. 骨应力刺激仪叩击治疗促进兔胫骨缺损内成骨及支架降解的实验研究. *中华创伤骨科杂志*, 2016, 18(10): 895-901.
- 丁真奇. 四种移植材料修复兔颅骨缺损的比较研究. 重庆: 重庆医科大学, 1993.
- Andersson L. Dentin xenografts to experimental bone defects in rabbit tibia are ankylosed and undergo osseous replacement. *Dental Traumatol*, 2010, 26(5): 398-402.
- Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am*, 1987, 18(2): 213-225.
- Brighton CT, Fisher JR Jr, Levine SE, *et al.* The biochemical pathway mediating the proliferative response of bone cells to a mechanical stimulus. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1996, 78(9): 1337-1347.
- Athanasiou KA, Zhu C, Lanctot DR, *et al.* Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone. *Tissue Eng*, 2000, 6(4): 361-381.
- 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. *中华创伤骨科杂志*, 2005, 7(8): 744-748.
- Wallace AL, Draper ER, Strachan RK, *et al.* The vascular response to fracture micromovement. *Clin Orthop Relat Res*, 1994, (301): 281-290.
- Ito H. Chemokines in mesenchymal stem cell therapy for bone repair: a novel concept of recruiting mesenchymal stem cells and the possible cell sources. *Modern Rheumatol*, 2011, 21(2): 113-121.
- Ladage D, Brixius K, Steingen C, *et al.* Mesenchymal stem cells induce endothelial activation via paracrine mechanisms. *Endothelium*, 2007, 14(2): 53-63.
- Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, *et al.* Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*, 2007, 131(2): 324-336.
- Simmons CA, Matlis S, Thornton AJ, *et al.* Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway. *J Biomech*, 2003, 36(8): 1087-1096.
- Grunewald M, Avraham I, Dor Y, *et al.* VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*, 2006, 124(1): 175-189.
- Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, *et al.* Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(3): 813-823.
- Qian D, Gong J, He Z, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells repair necrotic pancreatic tissue and promote

- angiogenesis by secreting cellular growth factors involved in the SDF-1 α /CXCR4 axis in rats. *Stem Cells Int*, 2015, (2015): 306836.
- 24 Granero-Moltó F, Weis JA, Miga MI, *et al.* Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells*, 2009, 27(8): 1887-1898.
- 25 Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, *et al.* Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature Medicine*, 2004, 10(8): 858-864.
- 26 Uchida D, Begum NM, Almofti A, *et al.* Possible role of stromal-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res*, 2003, 290(2): 289-302.
- 27 Burns JM, Summers BC, Yu W, *et al.* A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med*, 2006, 203(9): 2201-2213.
- 28 Wang YL, HE XM, Tang W, *et al.* Effect of stromal cell derived factor-1 α /CXCR4/CXCR7 axis on migration of the bone marrow mesenchymal stem cells. *Acta Anatomica Sinica*, 2014, (2014): 78-86.

收稿日期: 2018-11-07 修回日期: 2019-04-16

本文编辑: 刘丹