

综述



邹卫国, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心研究员、研究组长、博士生导师, 主要从事间充质干细胞/运动系统功能性干细胞、骨发育与重建及相关疾病机制的研究, 获国家自然科学基金委杰出青年科学基金、国家自然科学基金委优秀青年基金、国家高层次人才计划(青年类)资助, 主持国家重点基础研究发展计划(973计划)课题, 国家自然科学基金委重大项目课题、重点项目, 中国科学院战略性先导科技专项子课题等。发表论文70余篇, 以第一作者或通讯作者身份在*Nat Cell Biol*、*Mol Cell*、*Adv Sci*、*Nat Commun*、*Sci Adv*、*J Clin Invest*、*J Exp Med*、*Cell Res*等杂志发表了一系列研究成果。受邀担任*Bone Research*、*Bone*等杂志编委, 兼任ICMRS BOD Member-at-large、中国生物工程学会转化医学专业委员会副主任委员、中华医学会骨科学分会组织工程与再生医学青年组组长, 中国骨质疏松与骨矿盐疾病分会基础组常委、中国老年医学会骨质疏松分会创新与转化专委会常委等。

骨骼损伤修复的研究进展

任倩, 冯恒, 邹卫国*

(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200031)

摘要: 骨损伤发生后修复再生过程的机制解析对于骨修复治疗方法的优化和更新起到基础和关键作用。骨损伤发生后的各个阶段涉及不同细胞之间的协调和炎症反应、骨形成和骨吸收等事件的精准时空调控。近年来, 随着组织细胞类群研究的精细化和组织再生机制研究的深入, 骨修复再生过程中的各种细胞类型——免疫细胞、骨骼干细胞、成骨细胞等之间的相互调控研究逐渐增多, 各种生物活性材料更是为机制研究结论在促进骨修复中的临床转化上起到桥梁作用。本文从骨损伤后的炎症反应、骨骼干细胞在骨再生中的研究、材料在骨修复中的应用三个方面讨论骨骼损伤修复研究进展。

关键词: 骨骼损伤修复; 炎症反应; 骨骼干细胞; 生物活性材料

Research progress of bone injury repair

REN Qian, FENG Heng, ZOU Weiguo*

(Center for Excellence in Molecular Cell Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: The mechanism analysis of the repair and regeneration process after the occurrence of bone injury plays a fundamental and key role in the optimization and renewal of bone repair treatment methods. The various stages after bone injury involve the coordination among different cells and the precise spatiotemporal regulation of events such as inflammatory response, bone formation and bone resorption. In recent years, with

收稿日期: 2023-06-25

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFA0806600); 国家自然科学基金项目(82230082, 81991512, 81725010); 中国科学院稳定支持基础研究领域青年团队计划项目(YSBR-077)

第一作者: E-mail: renqian2018@sibcb.ac.cn

*通信作者: E-mail: zouwg94@sibcb.ac.cn

the refinement of research on tissue cell populations and the in-depth study of tissue regeneration mechanisms, research on the mutual regulation among various cell types, immune cells, skeletal stem cells, and osteoblasts in the process of bone repair and regeneration has gradually increased. A variety of biomaterials serve as a bridge for the transformation of mechanism research conclusions to clinical bone repair improvement. This review discusses the research progress of bone injury repair from three aspects: the inflammatory response after bone injury, the research of skeletal stem cells in bone regeneration, and the application of materials in bone repair.

Key Words: bone injury repair; inflammation response; skeletal stem cells; biomaterials

宏观层面上,骨是全身最为坚硬的组织,支撑起身体,在和骨骼肌、神经系统的合作中促使运动行为的发生;微观层面上,骨骼组织根据其位置的不同,具有不同的发育模式和细胞组成特点。骨中的各种细胞具有感受力学刺激并将其转化为生物学信号的功能^[1]。运动系统中,骨折是最常见的损伤类型之一。一方面成体后的骨修复再生过程被认为是重复了骨发育中的软骨内成骨和膜内成骨,而且骨痂组织和胚胎发育中的骨组织有转录组相似性^[2];另一方面,骨折或骨缺损等创伤引发的骨再生又伴随着剧烈的炎症反应和复杂多变的免疫细胞与骨系细胞的相互作用和调控^[3]。虽然骨折修复过程中的干预和治疗手段近年来得到明显改善,但是骨折中仍有部分损伤存在损伤延迟甚至骨不连的情况。因此,对骨损伤修复过程更细致的研究对于优化骨损伤的修复速率和质量十分重要,也是迫切需求。

组织损伤后的炎症反应在各种组织中都有广泛深入的研究,在骨里也不例外。创伤发生带来的急性炎症反应中,多种免疫细胞从破裂的血管涌入被打开的骨髓腔损伤处并释放炎症因子、细胞因子和趋化因子等对后续免疫细胞和骨形成、骨吸收相关细胞进行调节^[4]。

多年来,多组织来源的具有成骨分化潜能的间充质干细胞促进骨修复的临床转化话题被热烈讨论,但对于骨组织中存在的具有分化出完成细胞谱系能力的干细胞类群直到最近才由于干细胞转录组技术的飞速发展而被逐渐揭开^[5]。各种细胞表面标志物组合定义的骨骼干细胞类群在体外分化和体内移植等条件下都具有形成骨的能力。骨骼干细胞类群的鉴定、分离和体外扩增,结合材

料植入等途径,将为骨骼损伤修复提供新的治疗选择。

1 骨骼损伤修复过程概述

总体上,从骨损伤的发生到最终愈合,整个过程可大致被分为三个阶段:炎症期、修复期、重塑期。虽然根据骨损伤修复期间发生的主要事件将修复过程分为这三个阶段,但这并不意味着它们之间是严格区分开的。作为一个连续的过程,骨损伤修复不同阶段交接处这些事件同时发生^[3]。比如,炎症时期与修复时期交接时,虽然免疫细胞已经相对活跃度下降,但是成骨细胞在修复中逐渐加快的增殖仍然伴随着免疫细胞在损伤处的各种帮助组织损伤修复的细胞行为。

骨损伤修复初期的炎症反应通过其复杂的细胞互作网络联合免疫细胞、骨骼干细胞(skeletal stem cells, SSCs)、内皮细胞等多种细胞,通过促进血管及神经形成、骨骼干细胞迁移、分化和增殖,启动了骨损伤的修复过程。在这之后与炎症时期部分重合的修复期,被认为主要来自骨外膜的骨骼干细胞分化为成骨细胞(osteoblasts)通过膜内成骨(intramembranous bone formation)参与到修复中初步的骨痂形成^[6]。随着之后的软骨细胞驱动的软骨内成骨(endochondral ossification),软骨骨痂形成。骨痂的形成相比之前的血肿使得骨受损处得到进一步加固,也减少了断端所受的组织张力。软骨的钙化伴随着血管的长入,血管带来了各种类型的细胞和营养成分,并进入之前被软骨细胞占据的低氧环境。

当损伤的骨周围充满新形成的骨,骨外膜骨痂的吸收,标志着骨重塑阶段的开始。此时多数

在炎症期高表达的细胞因子表达已经显著下降,而在修复期蓬勃发展的血管生成和扩张也逐渐收势,回到损伤前的水平。修复期间形成的多余骨组织在重塑期被吸收,使骨最终回到损伤前的形态,也能够正常执行其受力功能^[7]。

2 炎症在骨骼修复中的作用

2.1 骨损伤修复中的炎症反应

骨损伤导致的骨内及周围软组织血管破裂带来的血管舒张和血小板、白细胞渗出直接引发了炎症时期的启动。包括骨在内,组织器官的创伤通常都会迅速引发先天免疫反应和适应性免疫。在骨缺损处,纤维蛋白原(fibrinogen)转化为纤维蛋白(fibrin),随之发生的是血肿(hematoma)的形成。血肿充当了重新建立骨连接的支架,包含了来自外周血的促炎和抑炎的免疫细胞和它们分泌的促炎和抑炎的细胞因子。首先被募集到血肿处的是被死细胞和组织碎片吸引来的多形核中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMNs)^[8]。只有约一天寿命的多形核中性粒细胞被迅速募集后,通过释放细胞因子,如CCL2(C-C motif chemokine 2)来招募能相对长时间存在的巨噬细胞(macrophages)。在急性炎症阶段,被激活至促炎类型的M1型巨噬细胞通过释放促炎因子、趋化因子、生长因子等来行使吞噬细菌、坏死细胞并进一步放大炎症反应、招募后续适应性免疫细胞以及促进骨形成等功能。在巨噬细胞之后,是淋巴细胞等其他免疫细胞迁移到骨痂处,并由此启动适应性免疫反应^[9]。在炎症时期,来自各种免疫细胞种类丰富的细胞因子(cytokines)如IL-1(interleukin-1)、IL-6(interleukin-6)、RANKL(receptor activator of nuclear factor κ b ligand)、Mcsf1(macrophage colony-stimulating factor 1)等参与到组织修复中的细胞间相互作用^[10]。随着急性炎症刺激因素消失,免疫细胞的急性炎症反应开始减弱,促炎因子的产生和释放减少,抑炎因子释放逐渐增加,浸润在损伤处的中性粒细胞凋亡并被巨噬细胞吞噬,也不再有大量新的中性粒细胞涌入。巨噬细胞类群中的主导细胞类群也从促炎型转变为抑炎型。急性炎症的逐渐消退伴随着慢性炎症和纤维化。此时,损伤修复处遍布巨噬细

胞、淋巴细胞和成纤维细胞。M2型巨噬细胞、Treg细胞、Th2细胞等将介导急性炎症的消退^[11]。

与骨发育过程相似,骨从损伤到修复再生需要经历软骨内成骨和膜内成骨这两个过程。但不同的是,骨损伤后剧烈的炎症反应占主导地位,提示炎症反应和免疫细胞在损伤后骨再生的启动中可能发挥着重要作用,损伤后早期如果使用抗炎药物,会降低修复效率甚至增加骨不连的风险^[12]。慢性炎症不利于骨修复,其中TNF- α 和NF- κ B信号通路的持续激活会促进破骨细胞的分化和激活,从而抑制骨形成和骨修复^[13]。

先天免疫和适应性免疫缺失以及缺乏功能性免疫细胞均可导致小鼠骨折后影响软骨内成骨。促炎细胞因子TNF- α 或TNF- α 受体的缺失都会导致骨折后软骨内成骨过程的延迟^[14,15]。IL-6的敲除会使骨折后损伤修复处的破骨过程减弱并延迟了骨痂的正常形成^[16]。这些促炎因子的缺失虽然可能会导致修复早期过程部分受阻,但最终骨修复依然能完成。这说明炎症因子对骨修复的影响还是通过早期影响免疫微环境来实现的,而随着后期促炎阶段的消退,后续的成骨阶段等不再受影响,骨修复虽然前期被延迟也能最终完成。T淋巴细胞通过分泌IL-17等因子促进骨缺损修复中的骨形成^[17]。

适度的急性反应对于骨是必需的,但免疫失调、细菌感染或身体其他原因导致的过度急性免疫和促炎因子过多的免疫微环境则同样不利于骨修复。介导急性炎症消退的关键抑炎因子IL-10的敲除小鼠被发现骨折后骨吸收增强,骨形成减弱^[18]。促炎因子TNF- α 的过表达能带来破骨细胞的激活并抑制干细胞和成骨的成骨分化和骨形成^[19]。在同时伴随骨骼肌持续严重损伤的大鼠骨折模型中,M1巨噬细胞长时间占据主导位置,骨修复受到抑制^[20]。

2.2 炎症调节对骨修复的影响

随着炎症反应在骨修复中的关键作用和机制被解开,调节炎症反应即改变免疫微环境就一直被视作优化骨再生治疗的途径之一。机制研究也证明不同的炎症因子组合对于间充质干细胞的分泌组学有不同的影响。IFN- γ 预处理的间充质干细胞倾向于分泌PGE2、CCL2等免疫调节因子;

TNF- α 预处理的间充质干细胞也有与IFN- γ 预处理类似的作用并促进细胞的成骨分化^[21,22]。IL-17A对间充质干细胞的预处理则能够增强IL-6和调节性T细胞的生成并抑制Th1型细胞因子的分泌,能增强间充质干细胞的成骨分化并抑制其成脂分化^[23]。IL-6对间充质干细胞的预处理也被报道具有增强的ALP活性和矿化作用^[16]。除了对具有成骨能力的细胞进行改变其免疫调节特性的预处理,在损伤处通过炎症因子的递送来直接调控免疫微环境也是一种选择。在骨损伤动物模型中,抑炎因子IL-4和IL-13不论是通过结合到支架材料直接植入伤处,还是在修复早期直接进行伤处注射,都能促进骨损伤后的骨形成和血管形成^[24,25]。低浓度的IL-10注射能通过激活p38/MAPK信号通路促进骨形成^[26]。

免疫细胞类群复杂多样,组织修复过程中免疫细胞间的协同作用和类群更替,以及免疫细胞和成骨细胞的相互作用机制还需要更多的体内外研究进行阐释。

3 骨骼损伤修复中的骨骼干细胞研究

3.1 骨骼干细胞研究进展

组织干/祖细胞来源及稳态调控一直被作为人类最终对抗疾病和衰老的利器来进行探索和研究。由于获取和培养的难度较低,骨的干细胞研究来源于骨髓的间充质干细胞(也称为间充质基质细胞, mesenchymal stem/stromal cells, MSCs)开始^[27],但止于体外成骨、成脂多向分化能力等指标,且所谓的间充质干细胞也可来源于脂肪等骨之外的组织器官。真正意义上的能从一群细胞分化发展成为有骨与软骨甚至骨髓腔结构的干细胞类群的答案似乎并不建立在间充质干细胞的相关研究成果之上。

由于骨本身的组织结构特异性和复杂性,特定位置(如生长板、软骨外膜、骨外膜等)细胞的获得比较困难,骨组织干细胞的研究比其他实质器官和血液研究较为落后。最近十年,谱系示踪技术及相关工具小鼠的分享利用和不断精细化的单细胞测序和数据分析技术一起为骨骼干细胞的发现提供了关键技术支持。

骨骼干细胞的概念最早由Paolo Bianco等提

出,被定义为一群组织原位的能够自我更新的干细胞,且可分化产生软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞和具有支持造血能力的基质细胞。借力于单细胞转录组测序技术和数据分析,并在此基础上通过细胞类群转录组信息筛选出标志物组合,小鼠和人骨骼干细胞的发现相继在2015年、2018年被报道。在利用小鼠寻找骨骼干细胞的过程中,他们发现,在长骨除去骨髓后包含完整骨外膜的骨皮质中,以及长骨生长板区域,都具有能分化发育为骨和软骨的干细胞。在阐释细胞类群时,研究者假设骨骼干细胞类群具有和血液系统的干祖细胞体系相似的异质性和层级特性,并通过包含CD45、CD105、CD200在内的多个标志物将这些细胞类群分为八个细胞类群,其中的7个都由骨骼干细胞分化发育而来^[28]。对分选出的骨骼干细胞的体外培养后性质检测发现,这群细胞的确能够分化出另外7个细胞类群。异种移植实验中,分选出的骨骼干细胞在一定条件下在肾包膜注射后分化成为骨细胞(osteocytes)和软骨细胞(chondrocytes)。这些都表明这群骨骼干细胞具有自我更新和向下分化的能力。显然,这套标志物组合并不意味着其为唯一的骨骼干细胞类群,因为越来越多的研究报道骨细胞也可来源于包括生长板、骨外膜等各个部位的、具有形成骨和软骨能力的骨骼干细胞类群。如BMP的拮抗物Gremlin1就被认为标记了一群具有成骨和成软骨能力的干细胞-骨软骨网状细胞(osteochondroreticular stem cells)^[29]。这群细胞位于长骨骨髓腔中干骺端(metaphysis),并且贡献于长骨生长发育、骨重塑和骨折损伤修复。论及骨骼干细胞在骨损伤修复中的作用,骨骼干细胞及其下游的骨骼、软骨和基质祖细胞(bone, cartilage, and stromal progenitor cells, BCSPs)在骨折损伤和关节软骨,甚至颌骨骨缺损修复中的促修复功能以及和损伤组织环境细胞的相互调控都被证实。骨折后,髓、软骨和基质祖细胞中部分被细胞表面标志物CD49f标记的细胞会响应损伤信号,从而由静息态转变为激活态并发生扩增,这些细胞最终通过软骨内成骨形成帮助断骨愈合的骨痂(callus)^[30]。利用BMP2和VEGF受体拮抗剂帮助微裂隙(即在关节表面钻出微小的孔, microfracture)激活的骨骼干细胞向关节软

骨而不是纤维软骨分化, 促进关节软骨磨损后的再生^[31]。下颌骨骨缺损修复过程中, 骨骼干细胞通过旁分泌途径与施旺细胞(Schwann cell)相互调控, 促进修复进程^[32]。骨骼干细胞的稳态也受到机体衰老的影响。骨骼干细胞的衰老通过自身性质改变和对骨髓微环境的调控, 使骨组织整体变得更加脆弱, 不易再生。除此之外, 骨骼干细胞对于长骨发育的调控^[33]、其他骨骼干细胞类群的发现也被逐渐报道^[34]。

以上证据都说明骨组织中存在类群多样的干/祖细胞^[35], 受到活跃而精密的调控, 参与到正常发育过程、损伤修复过程和衰老过程中的骨形成和重塑。

随着对骨外膜研究的深入, 对骨外膜功能的认识也从富含成纤维细胞的单纯的结构性组织转变到骨损伤修复过程中成骨细胞的重要来源部位^[36]。2018年, 由Ctsk标记的骨外膜干细胞(perosteal stem cells, PSCs)的发现也为骨外膜作为骨损伤修复过程中的重要支撑这一观点提供了有力证据^[37]。研究者通过单细胞和总体转录组数据分析发现, 这一群骨外膜干细胞在细胞性质上与上文提到的经典的骨骼干细胞或者间充质干细胞都不同。未损伤情况下, 这群骨外膜干细胞主要通过膜内成骨的方式实现骨形成, 但骨折等损伤可以激活骨外膜干细胞软骨内成骨的能力。也正因为骨外膜对于骨损伤修复再生的重要性逐渐被认识, 骨外膜干细胞类群的探索也常利用骨折和骨缺损等骨损伤模型, 损伤修复中类似于骨发育早期的细胞行为和组织稳态调节为发现具有促进组织再生功能的新的骨外膜干细胞类群提供了有利的外部环境^[38]。

3.2 骨损伤修复中骨骼干细胞可能发挥的功能

干细胞的高效激活和扩增对组织修复再生是必需的。在骨损伤修复中, Gli1等^[39]和Böhm等^[40]都发现了能被损伤诱导扩增的干细胞类群。2019年发表的文章报道了一群被标志物Mx1和 α SMA共同标记的驻留在骨外膜的成体干细胞(perosteal stem cells, PSCs)^[41]。这群细胞能在骨缺损后迅速迁移到损伤部位并为骨再生提供成骨细胞和软骨细胞。这种迅速的迁移行为受到CCL5及其受体的调控。该项研究将对骨外膜干细胞的研究聚焦到

驻留在骨外膜的内源性成体干细胞, 这种研究范围的细化所基于的假设是, 在机体发育成熟到衰老的过程中, 组织损伤修复很有可能是依赖一群本身驻留在骨外膜的内源性的成体干细胞来完成的。一项关注骨外膜干细胞异质性的研究提出, α SMA标记了一群处于静息状态的成体干细胞, 在骨折损伤修复中作为成骨细胞和软骨细胞的祖细胞。而Col2.3⁺成骨细胞则在骨痂形成过程中贡献了约10%的成骨细胞, 但并不形成软骨^[42]。

虽然骨外膜这一结构细胞在成体生理条件下更替并不活跃, 但是骨外膜的胞外基质却含量丰富, 为包括力学刺激和生长因子梯度分布等在内的多种细胞外信号的传递提供了物质结构基础。

在骨损伤修复再生过程中, 除了研究最核心的骨外膜干细胞类群之外, 胞外基质的组分稳态也为促修复的细胞行为提供了外部环境支撑。2018年, 有研究利用骨折损伤模型和细胞移植对骨髓来源的间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)和骨外膜细胞(perosteal cells, PCs)进行促修复能力的直接比较^[43], 他们的比较结果认为, 来源于骨外膜的细胞在修复过程中具有比骨髓来源的干细胞更强的克隆形成和向骨与软骨分化的能力, 机制上发现, 与骨髓来源的间充质干细胞相比, 骨外膜细胞具有高表达periostin等胞外基质的特点, periostin的缺失直接导致了骨修复能力的减弱。由此可以看出, 骨外膜细胞自身表达的丰富的胞外基质对于骨外膜细胞在骨损伤后迅速做出反应的能力是必不可少的。将骨髓来源的干细胞与骨外膜来源的干细胞放在骨折损伤模型中进行再生修复能力的比较, 考虑到了两种干细胞来源的不同, 骨髓中具有成骨和成软骨能力的干/祖细胞多伴随骨髓中丰富的血管, 且分泌造血干细胞微环境相关的因子, 因为这些细胞与血管和造血干细胞之间的相互作用塑造了骨髓中的细胞微环境^[44]。而对于骨外膜的骨骼干细胞来说, 骨外膜的细胞微环境和细胞受力状态则与骨髓完全不同。甚至对于运动系统来说, 在受力过大产生损伤时骨髓与外表的皮质骨发生损伤的概率都可能不同。因此, 从实际角度来说, 骨髓和骨外膜两种环境塑造了干细胞对稳态维持和损伤修复等多种状况的不同的反应能力。

4 生物活性材料在骨骼损伤修复中的应用

4.1 骨骼损伤修复中应用的生物活性材料种类和应用方法

随着人口老龄化和糖尿病等和骨修复相关代谢疾病发病率的增加,骨缺损修复相关外科手术中对各种生物活性材料的应用和需求都在增加,基础研究中提出的各种可能应用于促进骨修复再生的材料种类也在不断增加。合适的生物活性材料通过和生物大分子、细胞等元素的结合,能起到增加细胞黏附、分化、增殖能力的作用并最终促进骨修复再生^[45]。

生物活性材料具有丰富的类型,各自具有不同的原料组成、材料结构和物理性质^[45]。具有多孔结构的羟磷灰石生物陶瓷是目前应用最广泛的骨组织替代材料。多孔结构使组织细胞在材料空间中生长、黏附并保持细胞活性甚至形成骨单位结构,有利于增强材料与机体组织的稳定结合,避免材料移植后的松动、脱落等问题^[46]。

来源于动植物的生物聚合物具有可再生、高生物兼容性、可生物降解等特性,包括壳聚糖、胶原、明胶、纤维素和透明质酸等材料^[47]。天然来源的材料具有安全性高的优势,植入后具有促进骨组织中重要组分-细胞外基质形成的能力,于体内可降解,又由于其聚合物相对分子质量大的特性可以在体内维持一定的时间。但显而易见的是,由于不具备和骨组织类似的硬度和刚度等力学性质,这些聚合物不能在大面积骨缺损发生时直接作为替代材料被加以利用。

无机材料中包含金属和非金属类材料。相较于天然材料,金属材料优异的硬度和刚度力学性质使它们被广泛用于骨修复中,尤其是待修复的骨还需要承受较强的压力时。可供选择的金属材料有钛、钽、钴、镁合金等。纯金属在移植到机体骨环境中时会面临材料柔韧性不够、金属体腐蚀、无法与骨组织细胞形成稳定连接等问题,为了解决这些痛点,合金材料和在金属表面包被易于建立组织连接物质等方法被开发出来。比如,相较于纯钛金属,Ti6Al4V钛合金材料在应用中展现出更灵活的力学性质和更优的承压性能。另外,镁合金和锌合金生物材料具有能在体内降解

和较高组织兼容性的优势,省去了材料取出的步骤,避免了取出材料的二次手术^[48]。

以磷酸钙为基础的生物陶瓷在针对骨缺损修复的广泛研究中展示出良好的生物兼容性、生物可降解能力和成骨诱导性质。多孔的生物陶瓷支架在骨缺损中能够与骨组织有效稳定连接并使骨修复相关细胞充分长入。随着对骨修复过程理解的深入,生物活性材料被发现不仅影响具有成骨能力的干/祖细胞,也会对炎症反应、血管生成等修复过程中至关重要的过程产生调控作用^[49,50]。

得益于骨形成机制研究的进步,以及3D打印技术、静电纺丝技术、基因工程、细胞谱系示踪技术、单细胞转录组分析技术和干细胞体外培养体系的飞速发展,组织工程学中材料与蛋白等生物大分子和细胞的结合被认为在促进骨损伤修复再生中具有更大的潜力和更广阔的应用前景。合成材料提供的支架,结合能够产生骨胞外基质的具有成骨能力的细胞,同时为血管生成和新生组织形成提供空间。

细胞组分中,考虑到细胞的可得性,来自骨髓或脂肪组织以及外周血的间充质干细胞是被广泛利用的细胞来源^[51]。当然,随着骨骼干细胞研究的不断深入和细胞标记及分选技术的趋于成熟,更精细的骨骼干细胞亚群的分离和体外扩增以及自体利用也许能在人体中实现。包括IGF、PDGF、BMP等蛋白质在内的生长因子由于具有调控细胞增殖、分化和胞外基质分泌等作用,也被认为是在骨修复实践中与材料结合的可选成分。BMP首先被分离和应用用于骨损伤修复,并在多项研究中被证明能显著促进骨缺损恢复进程^[52]。

骨的受力和电活性特质更是催生了具有电活性或是力学响应功能的材料的产生。电活性支架材料在研究中被发现能够通过增强间充质干细胞、成骨细胞的成骨分化能力,促进血管生成、抑制骨吸收、免疫调节和抗菌等途径突进骨修复再生^[47]。

4.2 生物活性材料促进骨损伤修复的机制研究

生物活性材料通过对免疫细胞、骨形成相关干细胞、成骨祖细胞、血管内皮细胞等的影响,促进骨损伤修复中的炎症反应稳态、骨形成、血管形成等过程的效率。利用动物的各种骨损伤模

型结合材料的植入以及后期的 μ -CT、组织切片等技术方法能直观地看到材料在活体条件下对骨修复的影响,细胞在不同材料中立体培养则有利于解析材料的各种性质,如表面结构、立体结构、材料硬度等,对细胞的增殖、分化、黏附、迁移等行为能力的影响,以及生物活性材料怎样参与到骨修复相关细胞对外界信号的相应和信号通路的改变^[53]。

有钛类材料相关的研究提出,相较于光滑表面,粗糙表面能提高外源植入材料与本体骨组织的整合性,而且促进间充质干细胞的成骨分化^[54]。这种金属材料表面粗糙处理对细胞分化能力的调控可能是通过直接改变细胞形状和黏附状态并进一步影响整合素信号通路来实现的。对于金属材料,通过传统的喷砂或酸蚀等方法可以改变材料表面粗糙程度,这样的处理带来的是材料表面随机的不光滑。随着材料制作技术的革新,各种电脑建模和3D打印的结合,可以实现材料表面形貌结构更复杂的设计。

从脑组织到血管再到骨,细胞所处环境的机械硬度对其行为的关键影响力在各类组织中都有深入的探讨^[55]。骨作为无时无刻不在接受多种类型力学刺激的组织结构,植入材料的稳定性和力学响应能力也受到在体力学刺激的挑战。机械力刺激通过影响成骨相关细胞的重要胞外基质分泌、生长因子表达等调控细胞成骨进程。

正如骨折后血肿的形成成为后续的软骨内成骨和膜内成骨提供了一个原基,材料的应用在为骨缺损的修复提供了骨再生相关细胞生长的支架的同时,也以其本身的力学性质帮助维持骨的结构完整性。材料对骨再生相关细胞,尤其是骨骼干细胞、成骨祖细胞、成骨细胞等最直接的影响就是改变细胞形态、黏附状态、迁移到损伤处的能力甚至是各种细胞间的相互作用,这些都直接改变了细胞的胞外信号和细胞对于胞外信号的敏感性,进而影响到骨相关的信号通路,如TGF- β /BMP信号通路、WNT、YAP信号通路等。有研究通过BMP-2刺激培养细胞发现,表面有特殊立体结构的纳米材料与光滑表面的对照材料相比,能通过增强整合素与BMP-2的共定位来增加BMP-2受体活性并上调Runx2等促进成骨的下游基因的表

达^[56]。通过将WNT蛋白锚定在绷带材料上,可以实现对骨骼干细胞的不对称分裂现象的促进,从而增强骨修复过程中的成骨效率^[57]。整合素作为庞大的受体家族参与到复杂的胞外信号到胞内信号转导的过程中,能与丰富种类的胞外基质及胞外信号因子结合并相互作用。有研究通过特制的生物活性材料呈递整合素供体因子来激活整合素信号通路,以促进内源性成骨细胞的分化和内皮细胞的血管形成能力并最终加速骨缺损修复^[58]。

生物活性材料的研究无论对于我们理解骨修复过程中的深层机制还是临床骨修复治疗方法的更新都具有关键意义和推动作用。随着各种成像技术、材料合成技术、骨细胞类群分析技术的精细化,材料对骨修复再生的影响机制将得到更深层次的阐释并催生出更安全高效的材料和应用方法。

5 小结与展望

骨损伤修复再生的过程中组织细胞发生的变化类似胚胎发育过程中的骨形成过程。控制肢体骨骼发育的基因有很多被发现在骨折修复过程中表达上调,胚胎骨骼发育过程中激活的组织形成通路基因也在骨痂处表达。因为骨折修复可以通过最后阶段的骨重塑使骨组织恢复损伤前的组织形态,且没有疤痕的形成,所以这在某种程度上再次启动了胚胎发育中骨形成激活状态的过程,也被认为是成体中少有的能通过组织再生真正实现组织修复的恢复类型。骨骼干细胞的研究仍然处于百家争鸣的状态^[5],这些在不同状态下被激活的多样的干细胞类群是否有相同的来源,类群间是否存在相互作用,在损伤修复和衰老过程中的相互关系如何,都有待持续深入的研究来解答。新型生物活性材料的开发研究和应用固然让我们看到了对骨修复临床治疗技术更新迭代的希望,但材料在应用过程中的一些不良反应,如材料植入后的毒性反应(铜和银材料部分)、过度的骨形成和骨的异位形成,都是治疗过程中面临的风险,也提示生物活性材料应用需要更加谨慎的实验和对结果的分析。尤其是结合了蛋白质甚至是活细胞的生物材料,如何使具有活性的物质在损伤微环境中有效促进缺损处的骨修复而不“节外生

枝”，是从材料研发到手术移植等步骤都需要谨慎考量的。

参考文献

- [1] Wang L, You X, Lotinun S, et al. Mechanical sensing protein PIEZO1 regulates bone homeostasis via osteoblast-osteoclast crosstalk. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 282
- [2] Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(1): 45-54
- [3] Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(3): 133-143
- [4] Yang N, Liu Y. The role of the immune microenvironment in bone regeneration. *Int J Med Sci*, 2021, 18(16): 3697-3707
- [5] Matsushita Y, Ono W, Ono N. Skeletal stem cells for bone development and repair: diversity matters. *Curr Osteoporos Rep*, 2020, 18(3): 189-198
- [6] Salhotra A, Shah HN, Levi B, et al. Mechanisms of bone development and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(11): 696-711
- [7] Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*, 2011, 42(6): 551-555
- [8] Bastian O, Pillay J, Alblas J, et al. Systemic inflammation and fracture healing. *J Leukocyte Biol*, 2011, 89(5): 669-673
- [9] Chung R, Cool JC, Scherer MA, et al. Roles of neutrophil-mediated inflammatory response in the bony repair of injured growth plate cartilage in young rats. *J Leukocyte Biol*, 2006, 80(6): 1272-1280
- [10] Kon T, Cho T, Aizawa T, et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF- κ B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(6): 1004-1014
- [11] Schlundt C, Reinke S, Geissler S, et al. Individual effector/regulator T cell ratios impact bone regeneration. *Front Immunol*, 2019, 10: 1954
- [12] Foulke BA, Kendal AR, Murray DW, et al. Fracture healing in the elderly: a review. *Maturitas*, 2016, 92: 49-55
- [13] Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, et al. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*, 2016, 86: 119-130
- [14] Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF- α signaling: the role of TNF- α in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(9): 1584-1592
- [15] Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*, 2008, 14(2): 179-186
- [16] Bastidas-Coral AP, Hogervorst JMA, Forouzanfar T, et al. IL-6 counteracts the inhibitory effect of IL-4 on osteogenic differentiation of human adipose stem cells. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 20520-20532
- [17] Ono T, Okamoto K, Nakashima T, et al. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells enhance bone regeneration. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 10928
- [18] Jung YK, Kim GW, Park HR, et al. Role of interleukin-10 in endochondral bone formation in mice: anabolic effect via the bone morphogenetic protein/smad pathway. *Arthritis Rheumatism*, 2013, 65(12): 3153-3164
- [19] Adamopoulos IE. Inflammation in bone physiology and pathology. *Curr Opin Rheumatol*, 2018, 30(1): 59-64
- [20] Hurtgen BJ, Ward CL, Garg K, et al. Severe muscle trauma triggers heightened and prolonged local musculoskeletal inflammation and impairs adjacent tibia fracture healing. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2016, 16(2): 122-134
- [21] de Witte SFH, Franquesa M, Baan CC, et al. Toward development of mesenchymal stem cells for immunomodulatory therapy. *Front Immunol*, 2016, 6: 648
- [22] Noronha NC, Mizukami A, Calíari-Oliveira C, et al. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 131
- [23] Sivanathan KN, Rojas-Canales DM, Hope CM, et al. Interleukin-17A-induced human mesenchymal stem cells are superior modulators of immunological function. *Stem Cells*, 2015, 33(9): 2850-2863
- [24] Schlundt C, El Khassawna T, Serra A, et al. Macrophages in bone fracture healing: their essential role in endochondral ossification. *Bone*, 2018, 106: 78-89
- [25] Zheng Z, Chen Y, Wu D, et al. Development of an accurate and proactive immunomodulatory strategy to improve bone substitute material-mediated osteogenesis and angiogenesis. *Theranostics*, 2018, 8(19): 5482-5500
- [26] Chen E, Liu G, Zhou X, et al. Concentration-dependent, dual roles of IL-10 in the osteogenesis of human BMSCs via P38/MAPK and NF- κ B signaling pathways. *FASEB J*, 2018, 32(9): 4917-4929
- [27] Knight MN, Hankenson KD. Mesenchymal stem cells in bone regeneration. *Adv Wound Care*, 2013, 2(6): 306-316
- [28] Chan CKF, Seo EY, Chen JY, et al. Identification and specification of the mouse skeletal stem cell. *Cell*, 2015, 160(1-2): 285-298
- [29] Worthley DL, Churchill M, Compton JT, et al. Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. *Cell*, 2015, 160(1-2): 269-284
- [30] Marecic O, Tevlin R, McArdle A, et al. Identification and

- characterization of an injury-induced skeletal progenitor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(32): 9920-9925
- [31] Murphy MP, Koepke LS, Lopez MT, et al. Articular cartilage regeneration by activated skeletal stem cells. *Nat Med*, 2020, 26(10): 1583-1592
- [32] Jones RE, Salhotra A, Robertson KS, et al. Skeletal stem cell-schwann cell circuitry in mandibular repair. *Cell Rep*, 2019, 28(11): 2757-2766
- [33] Tsukasaki M, Komatsu N, Negishi-Koga T, et al. Periosteal stem cells control growth plate stem cells during postnatal skeletal growth. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4166
- [34] Weng Y, Wang H, Wu D, et al. A novel lineage of osteoprogenitor cells with dual epithelial and mesenchymal properties govern maxillofacial bone homeostasis and regeneration after MSFL. *Cell Res*, 2022, 32(9): 814-830
- [35] Jeffery EC, Mann TLA, Pool JA, et al. Bone marrow and periosteal skeletal stem/progenitor cells make distinct contributions to bone maintenance and repair. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(11): 1547-1561.e6
- [36] Li Q, Xu R, Lei K, et al. Insights into skeletal stem cells. *Bone Res*, 2022, 10(1): 61
- [37] Debnath S, Yallowitz AR, McCormick J, et al. Discovery of a periosteal stem cell mediating intramembranous bone formation. *Nature*, 2018, 562(7725): 133-139
- [38] Serowoky MA, Arata CE, Crump JG, et al. Skeletal stem cells: insights into maintaining and regenerating the skeleton. *Development*, 2020, 147(5): dev179325
- [39] Shi Y, He G, Lee WC, et al. Gli1 identifies osteogenic progenitors for bone formation and fracture repair. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 2043
- [40] Böhm AM, Dirckx N, Tower RJ, et al. Activation of skeletal stem and progenitor cells for bone regeneration is driven by PDGFR β signaling. *Dev Cell*, 2019, 51(2): 236-254
- [41] Ortinau LC, Wang H, Lei K, et al. Identification of functionally distinct Mx1+ α SMA+ periosteal skeletal stem cells. *Cell Stem Cell*, 2019, 25(6): 784-796.e5
- [42] Matthews BG, Novak S, Sbrana FV, et al. Heterogeneity of murine periosteum progenitors involved in fracture healing. *Elife*, 2021, 10: e58534
- [43] Duchamp de Lageneste O, Julien A, Abou-Khalil R, et al. Periosteum contains skeletal stem cells with high bone regenerative potential controlled by Periostin. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 773
- [44] Zhou BO, Yue R, Murphy MM, et al. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(2): 154-168
- [45] Tang G, Liu Z, Liu Y, et al. Recent trends in the development of bone regenerative biomaterials. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 665813
- [46] Sovova S, Abalymov A, Pekar M, et al. Calcium carbonate particles: synthesis, temperature and time influence on the size, shape, phase, and their impact on cell hydroxyapatite formation. *J Mater Chem B*, 2021, 9(39): 8308-8320
- [47] Dec P, Modrzejewski A, Pawlik A. Existing and novel biomaterials for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 529
- [48] Kaur M, Singh K. Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications. *Mater Sci Eng C*, 2019, 102: 844-862
- [49] Gao C, Peng S, Feng P, et al. Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Res*, 2017, 5(1): 17059
- [50] Solier S, Müller S, Cañeque T, et al. A druggable copper-signalling pathway that drives inflammation. *Nature*, 2023, 617(7960): 386-394
- [51] Xia L, Lin K, Jiang X, et al. Effect of nano-structured bioceramic surface on osteogenic differentiation of adipose derived stem cells. *Biomaterials*, 2014, 35(30): 8514-8527
- [52] Echave MC, Erezuma I, Golafshan N, et al. Bioinspired gelatin/bioceramic composites loaded with bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) promote osteoporotic bone repair. *BioMater Adv*, 2022, 134: 112539
- [53] Vermeulen S, Tahmasebi Birgani Z, Habibovic P. Biomaterial-induced pathway modulation for bone regeneration. *Biomaterials*, 2022, 283: 121431
- [54] Buser D, Brogini N, Wieland M, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res*, 2004, 83(7): 529-533
- [55] Heisenberg CP, Bellaïche Y. Forces in tissue morphogenesis and patterning. *Cell*, 2013, 153(5): 948-962
- [56] Lu ZF, Roohani-Esfahani SI, Li JJ, et al. Synergistic effect of nanomaterials and BMP-2 signalling in inducing osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*, 2015, 11(1): 219-228
- [57] Okuchi Y, Reeves J, Ng SS, et al. Wnt-modified materials mediate asymmetric stem cell division to direct human osteogenic tissue formation for bone repair. *Nat Mater*, 2021, 20(1): 108-118
- [58] Hao D, Liu R, Fernandez TG, et al. A bioactive material with dual integrin-targeting ligands regulates specific endogenous cell adhesion and promotes vascularized bone regeneration in adult and fetal bone defects. *Bioactive Mater*, 2023, 20: 179-193