

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.27.010

文章编号: 1005-8982(2017)27-0051-08

综述

骨血管生成机制与功能的研究进展*

董晤讯, 袁翰, 马勇, 郭杨, 苑文超, 李广广, 黄桂成

(南京中医药大学骨伤修复与重建新技术实验室, 江苏 南京 210023)

摘要: 骨骼是高度血管化的组织, 依赖于血管和骨细胞之间的密切关系, 以维持骨骼完整性。因此, 血管生成在骨骼发育、修复和重塑中起关键作用。骨血管是为骨细胞传递氧、营养素、激素、神经递质和生长因子等的主要通道, 骨血管还参与协调造血过程。骨毛细血管可以区分出两种亚型, 包括位于干骺端的 H 型和在骨干的骨髓腔中形成毛细血管网的 L 型。已有研究表明, 血管生成和骨形成的过程是偶联的, 这其中涉及多种细胞因子、信号通路及 microRNA 的参与。该研究回顾关于骨血管的结构、功能和相关调节因素的最新数据, 特别强调血管生成和血管功能在骨发育和再生中的作用及其在骨折愈合和骨组织工程中的应用。

关键词: 血管生成; 骨形成; 内皮细胞; 成骨细胞; 软骨细胞; microRNA

中图分类号: R681

文献标识码: A

Systemic review of mechanism and function of bone vascularization*

Wu-xun Dong, Han Yuan, Yong Ma, Yang Guo, Wen-chao Yuan,
Guang-guang Li, Gui-cheng Huang

(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210023, China)

Abstract: The bone is a highly vascularized organ which depends on intimate connection between blood vessels and cells to maintain its integrity. Thus, angiogenesis plays a pivotal role in development, repair and remodeling of bone. Blood vessel is the main channel for the transmission of oxygen, nutrients, hormones, neurotransmitters and growth factors for bone cells. Vessels are also involved in coordinating the hematopoiesis procedure. There are 2 subtypes of capillaries in bone, including H-type located in the metaphyseal and L-type in the backbone of the bone marrow cavity. Studies have shown that angiogenesis is closely associated with bone formation requiring cytokines, MicroRNA and other signaling pathways. In this paper, we reviewed the latest publications on the structure, function and related regulatory factors of bone vessels. More specifically, we emphasize on the role of angiogenesis and vascular function in development and regeneration of bone, which may provide therapeutic approaches in fracture healing and bone engineering.

Keywords: angiogenesis; bone formation; endothelial cells; osteoblasts; chondrocytes; MicroRNA

骨骼不仅为身体提供结构支持, 还参与运动、保护身体、制造红血球和白血球及储藏矿物质等生理活动。哺乳动物的骨主要有 2 种类型, 长骨和扁平骨均以不同的方式形成。长骨通过软骨骨化形成, 在该过程中, 骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem

cells, MSCs) 分化成不同类型的造骨细胞, 即软骨细胞、骨原细胞和成骨细胞, 先形成无血管的软骨板, 塑造骨的基本形态, 之后新骨和骨髓逐渐取代软骨板; 而扁平骨由膜内骨化形成, MSCs 直接分化为成骨细胞谱系, 在局部聚集, 形成 1 个骨化中心, 分泌

收稿日期: 2017-05-24

* 基金项目: 江苏省高校研究生科研创新计划项目 (No: KYZZ16_0409); 江苏省金坛市科研计划项目 (No: JT2013070)

[通信作者] 黄桂成, E-mail: hgc@njutcm.edu.cn

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)促进骨形成。

研究表明^[1],骨形成与血管生成两者过程是偶联的。一方面,骨细胞分泌促血管生成因子,其中最重要的是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),触发包括血管内皮细胞、软骨细胞、成骨细胞和破骨细胞在内的细胞群产生信号应答。另一方面,骨血管内皮细胞释放可以作用于软骨细胞和成骨细胞谱系的细胞因子。此外,血管生成在骨发育和骨折修复中也起着重要作用,局部血管的变化也与许多骨骼疾病的进展有关,如骨质疏松症、骨坏死、类风湿性关节炎、骨肿瘤及转移等^[2]。

1 血管与血管生成

血管由不同类型的细胞组成。血管的内层由内皮细胞(endothelial cell, ECs)组成,外层由血管周围细胞组成。血管周围细胞嵌入到内皮下基底膜中,与毛细血管 ECs 和血管平滑肌细胞进行细胞间接触,而缺乏与 ECs 的物理接触。血管形成有两个过程:血管发生和血管生成。血管发生:在早期胚胎发育中,中胚层细胞分化为成血管细胞(ECs 和血细胞的祖细胞),其迁移到特定位置并聚集,形成第一原始血管;血管生成:通过一系列过程如 ECs 发芽,迁移,增殖,血管吻合和修剪来扩大现有血管网络。血管发生需要不同类型血管细胞之间广泛协调,以确保新血管功能的完全和稳定。大量研究表明^[3],由于局部微环境信号介导 ECs 中的特定分子对血管进行标记,所以针对不同器官,血管的形成具有特异性,骨血管系统也不例外。

1.1 骨血管结构

早期研究中使用染料注射和放射性显微照片使血管可视化,这对骨血管组织,特别是进入股骨头的动脉血管提供重要认识。早期研究表明,骨血管组织在不同种类哺乳动物中相似,包括大鼠,兔子,豚鼠和人类。近年来,随着各种研究技术的进步,如鉴定细胞类型特异性标记,转基因荧光报告基因,共聚焦和双光子显微镜成像,微计算机断层扫描(micro-CT),三维(3D)重建成像,以及组织处理和免疫染色方案的改进,使骨血管组织及其功能得到了进一步理解。

骨是高度钙化、富含基质的组织,同时也是高度血管化的组织,除了生长板和关节软骨,在骨骼系统的所有区域中均存在血管。基于标记表达和功能特征的差异,骨毛细血管可以区分出 2 种亚型:H 型和 L 型。H 型毛细血管位于干骺端,干骺端包含有无血

管的生长板,干骺端中的 H 型毛细血管在生长板附近互连为血管柱。该血管以及相邻密质骨骨内膜上的 H 型毛细血管与表达成骨细胞特异性转录因子 osterix 的骨原细胞相关,高水平表达血小板-内皮细胞粘附分子 CD31(platelet endothelial cell adhesion molecule-1)和内皮粘蛋白 EMCN(endomucin)。研究表明^[4],H 型血管内皮细胞的数量与年龄相关,与 H 型相反,L 型血管内皮细胞的数量不随年龄改变。

在长骨远端的横截面中,H 型血管密集排列,并且在生长板附近相互连接。而 L 型血管在骨干的骨髓腔中形成密集、高度分枝的毛细管网,表达较低水平的 CD31 和 EMCN。L 型毛细血管被密集的造血细胞包围,并且连接中央静脉。动脉和远端小动脉血不直接进入 L 型毛细血管,而是流入到干骺端和骨内膜上的 H 型毛细血管中。由于骨血管组织的这种特异性,血液通过动脉流入 H 型毛细血管,在干骺端和骨干交接处进入 L 型毛细管网,最终流入中央静脉^[5]。因此,可以在新生的长骨中检测到不同的代谢环境:由于缺乏直接的动脉血液和大量的造血细胞供应,骨干高度缺氧,而新生和青春期小鼠的干骺端则具有良好的氧供。

骨血管还含有不同类型的血管周细胞。在骨髓中,L 型血管的血管周细胞有 2 种类型,即瘦素受体(leptin receptor, LEPR)阳性细胞和趋化因子 CXCL12(C-X-C chemokine ligand 12)丰富的网状(CAR)细胞。研究表明^[6],血管周细胞分泌的信号分子如干细胞因子(SCF 或 KITL),CXCL12 和血管生成素,在调节造血过程中起着重要作用。LEPR 阳性细胞可表达血小板衍生生长因子受体 α (platelet-derived growth factor receptors, PDGFR α),但对周细胞标记物血小板衍生生长因子受体 β (platelet-derived growth factor receptors, PDGFR β)和神经/神经胶质抗原 2(neural/glial antigen 2, NG2)及硫酸软骨素蛋白聚糖 4(chondroitin sulfate proteoglycan 4, CSPG4)呈阴性。该巢蛋白-GFP 报告基因低表达的细胞具有分化为骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞的能力。在软组织中, α 平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin, α SMA)阳性的平滑肌细胞覆盖骨动脉,该细胞可表达 NG2,并具有分化成不同间充质细胞的能力。干骺端的 H 型毛细血管柱周围存在 PDGFR β + 和 NG2+ 血管周细胞,H 型毛细血管的 ECs 可通过分泌血小板衍生生长因子 B(platelet derived growth factor B, PDGFB)来调节这两种血管

周细胞^[7]。

综上,可以明确骨血管包含几种不同类型的血管周细胞群,其在调节造血,成骨和血管稳态中起着重要作用。

1.2 骨血管生成

骨血管由血管发生形成。鼠长骨的血管在胚胎发育第 13~14 d 开始侵入软骨板,并在成年之前不断生长^[8]。软骨内血管生成是 1 个复杂的过程:①软骨细胞在初级骨化中心(primary ossification center, POC)停止增殖,成为肥大软骨细胞,与骨原细胞一起分泌促血管生成因子并刺激血管生成;②血管侵入肥大软骨板,形成骨化过程中的初始血管网络,在发育的长骨两端,通过成熟和肥大生长板,软骨细胞释放信号,进一步促进血管生长和骨化,使骨骼生长延伸;③血管在长骨的两个远端处侵入骺软骨板,形成二级骨化中心(secondary ossification center, SOC)。

扁平骨通过膜内骨化形成,因此没有软骨板。与长骨相似,扁平骨高度血管化。其血管化过程与软骨内血管生成过程相似,这表明两者分子机制类似。由于大多数研究涉及软骨内血管生成,本文将重点对软骨内血管生成进行综述。

1.3 骨血管生成相关信号因子及通路

目前,已有研究表明^[9],氧张力和 VEGF 家族生长因子是促进软骨内血管生成的主要因素,不但影响 ECs 和骨细胞谱系,而且证明血管生成和骨形成的过程是偶联的。

1.3.1 VEGF 信号转导 VEGF-A 是诱导血管生成的关键分子,由肥大软骨细胞高度表达和分泌。VEGF-A 主要通过结合其受体 VEGFR1(KDR/Flk-1)和 VEGFR2(Flt-1)来发挥作用。尽管 VEGF-A 对 VEGFR1 具有较高的亲和力,但是血管生成作用主要由 VEGFR2 介导。当结合 VEGFR1 时,VEGF-A 传递非常弱的有丝分裂信号,但是在结合 VEGFR2 后,内皮细胞接受非常强的有丝分裂信号。

VEGF-A 主要存在三大亚型:VEGFA120-可溶且不结合基质、VEGFA164-可溶或与基质结合、VEGFA188-难溶且高度结合基质。该亚型可引起不同的生物效应:仅表达 VEGFA120 的小鼠显示出软骨内血管生成与矿化减少,并且 POC 中成骨细胞标记物的表达降低。而 VEGFA164 或 VEGFA188 的表达即可诱导发育的 POC 中血管生成。成骨细胞谱系中 VEGFA164 过表达,可激活 β -连环蛋白信号通

路,刺激骨血管生成和骨形成^[10];然而,仅与基质结合的 VEGFA188 亚型的表达导致 SOC 血管生成受损,这表明可溶性 VEGF-A 的扩散是骨血管生成所必需的。

此外,ECs 中编码 VEGFR2 基因的特异性失活,可导致干骺端临近生长板的血管大量减少。PI3K-Akt 通路是活化的 VEGF 受体触发的主要信号通路之一。相对于 AKT2 和 AKT3,激酶 AKT1 在 ECs 中高表达,小鼠 AKT1 敲除后导致骨形成和血管生成减少^[11]。

1.3.2 缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF) 缺氧可激活各种细胞内信号通路,并通过 HIF 调节靶基因表达。HIFs 是异源二聚体转录因子,由 HIF- α 及 HIF- β 组成,其中,HIF- α 有 3 种,分别为 HIF-1 α 、HIF-2 α 及 HIF-3 α ;HIF- β ,即芳香烃受体核转运蛋白,也有 3 种,分别为 HIF-1 β 、HIF-2 β 及 HIF-3 β 。HIF- α 为功能性亚基,决定 HIFs 的活性,受细胞内氧浓度的调节;HIF- β 为结构性亚基,在细胞内稳定表达,起结构性作用,不受氧浓度的影响和调节。HIF1 α 和 HIF2 α 在低氧状态(<5%氧)下稳定表达。在常氧(>5%氧)中,HIF- α 与 Von Hippel-Lindau(VHL)蛋白结合后,被泛素连接酶 E3 受体识别,形成 E3 泛素连接酶复合物。HIF 靶基因参与多种生物过程,如无氧代谢和血管生成。软骨细胞利用无氧代谢在缺氧条件下存活,而 HIF1 α 调节许多在该过程中起重要作用的基因^[12]。因此,小鼠 HIF1 α 的敲除可导致生长板内部缺氧区的细胞大量死亡。

缺氧主要通过调控 VEGF 表达,促进血管生成。调控成骨细胞的 HIF-1 通路,使 VEGF 和其他血管发生相关因子过表达,可刺激骨血管生成及骨形成^[13]。因此,在成骨细胞中特异性的敲除 HIF1 α ,可导致骨血管生成和骨形成减少。相反,HIF1 α 在成骨细胞中特异性过表达或敲除 VHL 可导致骨血管生成和骨形成增加。HIF1 α 和 HIF2 α 也转录调节 ECM 基因的表达,并且缺失可导致 ECM 分泌受损,从而影响软骨形成和成骨。此外,ECs 中缺氧信号通路的激活也可引起 H 型毛细血管数量增加,从而使骨血管生成和骨形成增加^[14]。

1.3.3 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs) 尽管骨骼高度矿化并富含 ECM,但是骨骼在生长过程中仍会重塑,并保持修复能力。软骨细胞和成骨细胞分泌的基质分子对矿化至关重要。在血

管侵入到 POC 期间, MMPs 诱导 ECM 蛋白水解, 导致基质重塑、ECs 迁移和增殖^[15]。MMPs 主要由破骨细胞和血管细胞分泌, 其中 MMP-9 和 MMP-13 在骨血管生成和骨重塑中起重要作用。此外 MMPs 的蛋白水解活性可被组织金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs) 特异性抑制^[16]。

ECM 可通过整联蛋白家族异二聚体受体诱导细胞内信号转导, 这种基质-整联蛋白信号转导对于血管生成和血管完整性至关重要。与基质结合的 VEGF 可诱导 VEGFR2 活化延长和促分裂原活化蛋白 (mitogen-activated protein, MAP) 激酶 p38 的下游活化; 还可以诱导整联蛋白 β 1 亚基与 VEGFR2、粘着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 结合。综上, 可见 VEGF 与基质结合对于骨血管生成至关重要。MMPs 的基质修饰性质也可影响血管生成和骨形成。有研究表明^[17], MMP-9 敲除小鼠存在软骨内骨化缺陷, 该缺陷与 VEGF 的生物利用度不足有关, 而使用外源 VEGF 可避免该缺陷。这与早期研究一致, 表明 MMP-9 参与 ECM 释放 VEGF 的过程。在 MMP-13 突变小鼠中, 可见生长板和板状骨增加, 但在血管系统中无明显变化。相比之下, 缺乏 MMP-13 和 MMP-9 的双突变体小鼠, 软骨内血管生成及 ECM 重塑减少, 且伴有骨形成缺陷^[18]。本研究结果强调 MMPs 的重要作用, 表明其通过细胞基质和生长因子信号转导在多方面控制血管生成和骨形成。

1.3.4 成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 信号通路 FGF 具有 18 个配体, 可通过 4 种不同的酪氨酸激酶受体 (FGFR1-4) 发出信号, 诱导效应, 如细胞存活, 增殖和分化^[19]。在成骨期间, FGF2, FGF9 和 FGF18 以及受体 FGFR1-3 以阶段和细胞类型依赖的方式表达。受体 FGFR1 和 FGFR2 在骨血管中表达, 而 FGFs 由软骨细胞和成骨细胞分泌。此外, FGF 可诱导 VEGFA 和 VEGFR2 表达。FGF2 可增加血管内皮粘附分子 VE-钙粘蛋白 (或钙粘蛋白 5) 和紧密连接蛋白 ZO-1 (或 TJP1) 的表达, 从而刺激骨动脉血管扩张。在敲除 FGF2 的突变小鼠中, 骨小梁体积、矿物质附着和骨形成速率降低^[20]。FGF9 和 FGF18 可诱导软骨细胞增殖, 其缺失可导致软骨细胞增殖减少。在 FGF9 和 FGF18 特异性敲除小鼠显示出 VEGFA 表达减少, POC 血管形成延迟^[21]。此外, ECs 中编码 FGFR1/2 基因的特异性失活可导致血管通透性增加、骨血管周细胞缺失。本研究

表明, FGFR1/2 信号转导维持骨血管结构和功能的完整性。综上, 表明 FGF 信号通路参与血管生成和骨形成的调节。

1.3.5 Notch 信号通路 Notch 信号通路可调节 VEGF 的促血管生成作用。有研究发现^[22], ECs 中 Notch 信号通路的失活可引起 ECs 增殖和出芽增加, 导致软组织中血管过度增生。而激活骨 ECs 中 Notch 信号通路则可促进局部血管生成和骨形成。Notch 受控的 ECs 分泌头蛋白, 头蛋白是骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 通路的拮抗剂, 可促进相邻生长板中肥大软骨细胞形成。EC-特异性 Notch 缺失突变体, 即缺乏 Notch 配体 DLL4 或 Notch 控制的基因调节 RBPJ κ (recombination binding protein-J) 的介质的鼠, 表现出血管生成及 H 型血管减少、骨形成缺陷。有研究表明^[23], 在 EC-特异性突变体中, 由于成熟和肥大的软骨细胞缺陷, 导致 VEGF 的分泌减少, 并形成不规则和增大的生长板。与配体结合的 Notch 受体活化需要经历一系列蛋白水解切割过程, 其中之一便由 ADAM 家族金属蛋白酶 ADAM10 介导。因此, ECs 中 ADAM10 的缺失可导致骨生长受损和生长板缺陷, 这与其他 EC-特异性 Notch 功能缺失突变体中看到的表型一致^[24]。

1.3.6 骨血管生成相关 miRNA microRNA 已经被证实参与各种生理和病理过程^[25]。miRNA 的表观遗传调控是骨骼系统疾病研究的新领域^[26]。有研究表明, miRNA-126 可增强 VEGF 和成纤维细胞生长因子 FGF 的生成及作用; 通过抑制血管生成信号传导的细胞内酶抑制剂 Sprouty 相关蛋白 1 (sprouty-related protein 1, Spred-1) 的表达促进血管生成^[27]。miRNA-381 在异常 WNT1 诱导型信号通路蛋白 -1 (WISP-1) 诱导的 VEGF-A 表达和血管生成中具有重要作用。WISP-1 通过下调 miRNA-381 表达促进人骨肉瘤细胞中的 VEGF-A 表达, 随后诱导人内皮祖细胞 (EPC) 迁移和血管形成^[28]。血管生成是股骨头类固醇相关性骨坏死 (steroid induced osteonecrosis of the femoral head, SONFH) 的重要事件。研究表明^[29], 与 SONFH 相比, miRNA-210 在正常骨组织中甲基化, 导致该组织中 miRNA-210 表达的抑制。一旦股骨头发生骨坏死, miRNA-210 脱甲基化而表达上调, 相应地激活血管生成以用于股骨头愈合。用去甲基化剂处理的内皮细胞可以增加 miRNA-210 的表达, 同时促进细胞活力和分化。此外, 去甲基化处

理后细胞上清液增强机体募集微血管的能力。

1.3.7 其他生长因子和转录因子 结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF/CCN2)和激酶 c-RAF(RAF1)参与 VEGFA 表达的调节,进而参与骨血管生成。CTGF 是 CCN 家族的一员,分泌基质细胞蛋白,与生长因子和整合蛋白相互作用。在软骨内血管生成期间,软骨膜和肥大软骨细胞强表达 CTGF。CTGF 募集破骨细胞,促进肥大软骨细胞表达 VEGF、ECM 生成和骨发育。c-RAF 是 MEK1/2 (或 MAP2K1/2)激酶的上游激活剂,其控制 MAP 激酶信号通路活性。c-RAF 在肥大软骨细胞中强表达,其在该细胞中的缺失导致肥大软骨细胞凋亡和扩张减少。软骨细胞特异性 c-RAF 功能缺失可导致孕龄 15 d 半的胎鼠血管侵入 POC,以及 35 d 的新生鼠干骺端血管生成减少。此外,也有研究表明^[30],该变化与 VEGFA 降解增强相关,与编码 VEGFA164 和 VEGFA188 转录物的改变无关。

如上所述,肥大软骨细胞通过分泌促血管生成因子,促进血管生成,然而增殖的软骨细胞仍处于缺氧状态,抑制血管生长。研究表明^[31],增殖的软骨细胞通过分泌软骨调节蛋白 1(或 LECT1)和 tenomodulin 因子,抑制生长板和软骨血管化;SOX9 的失活/激活会阻碍血管生成,减少 VEGFA 表达,导致血管生成和骨形成减少。

2 血管生成在骨修复中的作用

以上论述表明骨骼系统中不同类型细胞之间的相互作用十分密切。成骨细胞谱系的软骨细胞产生 VEGFA 之类的促血管生长因子,同时血管又是作用于骨细胞信号的来源,两者相互作用影响骨发育和骨修复。血管实现了 Osterix 阳性骨原细胞从软骨膜到干骺端的迁移,进而促进了骨小梁的形成^[32]。由于生长因子和 ECs 诱导的 BMP 拮抗剂的产生,使得 Osterix 阳性细胞优先与干骺端和内皮中的 H 型毛细血管发生关联。远端小动脉直接连接干骺端和骨内膜 H 型血管,那么营养物质的供给将是形成骨祖细胞生长环境的重要因素^[33]。可见,血管生长和促血管生成信号之间的相互作用十分重要。

2.1 骨血管在骨折愈合中的作用

由于骨损伤和局部血管的破坏导致炎性细胞渗出和血肿形成,所以骨折愈合是一个极其复杂的过程。目前,虽然明确肯定血管在骨重建过程中的重要作用,但是在骨修复期间血管的重塑和重组机制尚

未完全明确,该过程是否引起不同来源的 ECs 的混合还有待探讨。血管向内生长的特性在软骨痂的形成过程中十分重要,不仅加快软骨内骨形成进程,还将愈伤组织转化成刚性钙化组织,从而实现血管重塑、骨修复^[34]。

研究表明^[35-36],促血管生成因子影响骨折愈合。在兔骨折模型中,应用 VEGF 对骨折区域进行治疗,加速了骨折愈合和血管生成。在小鼠骨折模型中,应用可溶性重组 VEGFR1(或 FLT1)融合蛋白阻断内源性 VEGF,可减少骨血管生成和愈伤组织矿化,抑制小鼠骨折愈合。VEGFR1 可分泌产生血管生长的负调节剂,炎症细胞表达 VEGFR1,并募集到组织损伤部位,进而影响骨折愈合。胎盘生长因子(PIGF 或 PGF)是 VEGF 家族的成员和 VEGFR1 的配体,也参与调节骨愈合,并控制一系列骨组织再生和病理过程。研究表明,PIGF 基因敲除小鼠模型炎症过度聚集、成骨和愈伤组织重塑减少,导致骨折难以修复^[37]。

FGF 信号的传导不但在骨形成和血管发生方面发挥重要作用,而且与骨修复联系密切。研究表明,在骨折愈合期间,FGF 和 FGF 受体表达增加,而且 FGF2 在骨修复期间,刺激血管生成和成骨^[38]。DJ-1 (PARK7)作为 MSCs 分泌的血管生成因子,可以活化 FGFR1 介导的信号传导,并在体外刺激血管生成和成骨细胞分化。另外,也有研究表明在大鼠骨折模型中,DJ-1 促进大鼠骨折的愈合。研究发现^[39],在 FGF9 基因复合突变体小鼠模型中显示骨损伤处,VEGF 和 VEGFR2 的表达降低,破骨细胞减少,且 MMP-9 的表达降低。针对该情况,可以通过重组 VEGFA 而促进部分组织愈合,而通过 FGF9 治疗则可以使受损部位完全修复。重组 VEGFA 和 FGF9 的联合应用不但可以促进 2 型糖尿病小鼠模型中的血管产生,而且有助于成骨和骨再生的增加^[40]。

转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β), BMP 和生长分化因子(growth differentiation factor, GDF)也在发育期间控制骨形成并刺激骨修复。研究表明^[41],在动物模型中全身注射 TGF- β ,可增加愈伤组织体积和骨强度。在愈合过程中,TGF- β 介导软骨细胞和骨原细胞的分化并刺激基质产生,但目前其在血管发生中的潜在作用尚未明确。BMP 信号传导刺激间充质和骨原细胞增殖和分化,BMP2 和 BMP7 可以诱导骨形成、刺激骨修复,诱导 VEGF 表达、刺激血管生成^[42]。

以上研究表明,在骨折愈合、骨形成期间,控制

血管生成的途径多样,主要集中在细胞分子、信号通路方面。其中间充质干细胞中的 Notch 信号通路,可促进其增殖并抑制分化。但是 Notch1 的过表达可导致成骨细胞谱系中细胞的增殖和分化,而抑制成骨细胞中 Notch 信号传导,可引起老年小鼠骨质疏松的发生^[43]。目前,仍需要大量研究揭示信号传导通路之间的相互作用,并探索潜在的治疗应用,以防止骨丢失并促进骨折愈合。

2.2 骨血管生成在组织工程骨中的应用

目前组织工程骨的血管化不足、缺乏功能性血管已成为其发展进入临床应用的重大障碍。国内外许多研究证实,血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)可以通过增强骨修复过程中的血管生成与骨形成能力来促进骨缺损修复^[44]。移植的 EPCs 通过直接形成新血管可提高早期血管形成。同时,移植的 EPCs 释放趋化因子(VEGF)以招募宿主的 EPCs 并刺激骨缺损中的血管形成^[45]。一项将 EPCs 和 MSC 共培养形成的细胞片移植到大鼠牙槽骨缺损模型中的研究显示,与 MSC 单独移植相比,EPC-MSC 细胞片的移植可以更好地改善大鼠牙槽骨缺损模型的骨再生。EPC-MSC 细胞片中血管生成基因(VEGF-A 和 KDR)的表达高于 MSC 片段。EPC-MSC 共培养移植可诱导血管生成生长因子上调,产生有利于血管生成和成骨的环境^[46]。有研究将单纯 EPCs、BMSCs 及联合培养组的组织工程骨移植到兔四肢肌袋内,移植后随时间延长成骨增加,新生血管长入增多。提示 EPCs 可加快组织工程骨内新生血管及血管网的形成,增加 BMSCs 的存活数量,提高其增殖和成骨转化能力^[47]。有研究发现,EPCs 与 MSCs 共接种比例为 1:1 时,MSCs 的细胞存活能力最强,可以提高组织工程骨的细胞上架率。基于 EPCs 的预血管化策略能促进组织工程骨在体内更早地实现血管化,以恢复骨缺损区的血供^[48]。另外一项研究表明,局部移植 hEPCs 增加血管密度和成骨,而矿物质密度没有变化。hEPC 的局部移植显示出良好的安全性,在局部 hEPC 移植后 5 个月,在组织和器官水平上,在移植部位或远处器官中无炎症反应或发育异常变化^[49]。

3 未来展望

骨骼系统的形成和体内平衡依赖于不同细胞的整合活性。然而,ECs 是控制软骨细胞和成骨细胞的信号的关键来源,从而为在血管生成和成骨期间的耦

合提供契机。

骨形成和血管生成之间的联系,对深入了解骨疾病和衰老具有重要的意义。骨骼在生物体的存活期间持续重塑,该作用主要体现在成骨细胞和破骨细胞之间的持续动态平衡。骨形成和再吸收之间的平衡是维持骨骼强度和功能的关键,因此,其状态失衡可导致骨矿物质密度降低、骨质疏松性骨丢失和骨折风险增高。年老时,骨吸收因激素和其他因素的变化而增加,而成骨作用逐渐下降^[50]。在卵巢切除小鼠骨质疏松模型中,血管中高表达的 CD31 减少^[51],表明其在局部血管的改变可能有助于病理状态的改变。同时,也为通过调控骨血管生成用于预防因年龄或疾病引起的骨量丢失疾病的治疗提供新的方法,为缺血性坏死疾病的治疗提供新思路。然而,诸多研究仍然停留在基础实验研究阶段,至于能否在临床研究中取得好的结果还尚不清楚。尽管如此,骨血管和 ECs 亚群在各种生理和病理环境中作用确切,这也将增强笔者对骨骼系统疾病机制的进一步了解。

参 考 文 献:

- [1] PORTAL-NUNEZ S, LOZANO D, ESBRIT P. Role of angiogenesis on bone formation[J]. *Histol Histopathol*, 2012, 27(5): 559-566.
- [2] BOHM A M, DIRCKX N, MAES C. Recruitment of osteogenic cells to bone formation sites during development and fracture repair-German Version[J]. *Z Rheumatol*, 2016, 75(3): 316-321.
- [3] JARVINEN T A, MAY U, PRINCE S. Systemically administered, target organ-specific therapies for regenerative medicine [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(10): 23556-23571.
- [4] KUSUMBE A P, RAMASAMY S K, ADAMS R H. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone[J]. *Nature*, 2014, 507(7492): 323-328.
- [5] RAMASAMY S K, KUSUMBE A P, WANG L, et al. Endothelial notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone[J]. *Nature*, 2014, 507(7492): 376-380.
- [6] YONG K S, KENG C T, TAN S Q, et al. Human CD34 (lo) CD133(lo) fetal liver cells support the expansion of human CD34 (hi) CD133 (hi) hematopoietic stem cells[J]. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13(5): 605-614.
- [7] SA DA BANDEIRA D, CASAMITJANA J, CRISAN M. Pericytes, integral components of adult hematopoietic stem cell niches[J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 171: 104-113.
- [8] FILIPOWSKA J, TOMASZEWSKI K A, NIEDŹWIEDZKI Ł, et al. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning[J]. *Angiogenesis*, 2017(93): 33-39.
- [9] DRAGER J, HARVEY E J, BARRALET J. Hypoxia signalling manipulation for bone regeneration [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2015, 17: e6.

- [10] NIDERLA-BIELINSKA J, CISZEK B, JANKOWSKA-STEIFER E, et al. Mouse proepicardium exhibits a sprouting response to exogenous proangiogenic growth factors in vitro[J]. *J Vasc Res*, 2016, 53(1/2): 83-93.
- [11] GAN Z Y, FITTER S, VANDYKE K, et al. The effect of the dual PI3K and mTOR inhibitor BEZ235 on tumour growth and osteolytic bone disease in multiple myeloma[J]. *European Journal of Haematology*, 2014, 94(4): 343-354.
- [12] KOSYNA F K, NAGEL M, KLUXEN L, et al. The importin α/β -specific inhibitor Ivermectin affects HIF-dependent hypoxia response pathways[J]. *Biological Chemistry*, 2015, 396(12): 1357-1367.
- [13] JIN Z, YU A, QI B, et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor-1 alpha radiosensitized MG-63 human osteosarcoma cells in vitro[J]. *Tumori*, 2015, 101(5): 578-584.
- [14] RAMASAMY S K, KUSUMBE A P, SCHILLER M, et al. Blood flow controls bone vascular function and osteogenesis[J]. *Nature Communications*, 2016(7): 13601.
- [15] LINGHUI DAI, XIN ZHANG, XIAOQING HU. Silencing of microRNA-101 prevents IL-1 β -induced extracellular matrix degradation in chondrocytes[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2012, 14(6): R268.
- [16] COVEN I, OZER O, OZEN O, et al. Presence of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor matrix metalloproteinase-2 gene polymorphisms and immunohistochemical expressions in intracranial meningiomas[J]. *Journal of Neurosurgery*, 2014, 121(6): 1478-1482.
- [17] RAJASEKARAN N, ILLGES H. Matrix metalloproteinase MMP-9 promotes K/BxN serum induced arthritis in mice[J]. *Open Journal of Rheumatology & Autoimmune Diseases*, 2014, 4(1): 22-28.
- [18] ZHANG Y, HUANG H, ZHAO G, et al. ATP6V1H deficiency impairs bone development through activation of MMP9 and MMP13[J]. *Plos Genetics*, 2017, 13(2): e1006481.
- [19] KATOH M. Therapeutics targeting FGF signaling network in human diseases[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2016, 37(12): 1081-1096.
- [20] MI R B, KIM A R, HWANG J H, et al. FGF2 stimulates osteogenic differentiation through ERK induced TAZ expression[J]. *Bone*, 2014, 58(1): 72-80.
- [21] HUNG I H, SCHOENWOLF G C, LEWANDOSKI M, et al. A combined series of Fgf9, and Fgf18, mutant alleles identifies unique and redundant roles in skeletal development[J]. *Developmental Biology*, 2016, 411(1): 72-84.
- [22] WANG C, INZANA J A, MIRANDO A J, et al. NOTCH signaling in skeletal progenitors is critical for fracture repair[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2016, 126(4): 1471.
- [23] KOHN A, DONG Y, MIRANDO A J, et al. Cartilage-specific RBPj κ -dependent and -independent Notch signals regulate cartilage and bone development[J]. *Development*, 2012, 139(139): 1198-1212.
- [24] ZHOU J, FUJIWARA T, YE S, et al. Downregulation of notch modulators, tetraspanin 5 and 10, inhibits osteoclastogenesis in vitro[J]. *Calcified Tissue International*, 2014, 95(3): 209-217.
- [25] BARTEL D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [26] FRANCESCA M, LUISELLA C, LUISA B M. Epigenetic Mechanisms in bone biology and osteoporosis: can they drive therapeutic choices[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(8): 1329.
- [27] SUN J J, ZHENG X H, WANG L Y, et al. New bone formation enhanced by ADSCs overexpressing hRunx2 during mandibular distraction osteogenesis in osteoporotic rabbits[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2014, 32(5): 709-720.
- [28] TSAI H C, TZENG H E, HUANG C Y, et al. WISP-1 positively regulates angiogenesis by controlling VEGF-A expression in human osteosarcoma[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8(4): e2750.
- [29] YUAN H F, CHRISTINA V R, GUO C A, et al. Involvement of microRNA-210 demethylation in steroid-associated osteonecrosis of the femoral head[J]. *Scientific Reports*, 2016(6): 20046.
- [30] LIU E S, RAIMANN A, CHAE B T, et al. c-Raf promotes angiogenesis during normal growth plate maturation[J]. *Development*, 2016, 143(2): 348-355.
- [31] LEFEBVRE V, DVIR-GINZBERG M. SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage[J]. *Connect Tissue Res*, 2017, 58(1): 2-14.
- [32] NGUYEN T M, ARTHUR A, PATON S, et al. Loss of ephrin B1 in osteogenic progenitor cells impedes endochondral ossification and compromises bone strength integrity during skeletal development[J]. *Bone*, 2016(93): 12-21.
- [33] SHOHAM A B, ROT C, STERN T, et al. Deposition of collagen type I onto skeletal endothelium reveals a new role for blood vessels in regulating bone morphology[J]. *Development*, 2016, 143(21): 3933-3943.
- [34] ALMUBARAK S, NETHERCOTT H, FREEBERG M, et al. Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration[J]. *Bone*, 2016(83): 197-209.
- [35] UDEHIYA R K, AMARPAL, AITHAL H P, et al. Comparison of autogenic and allogenic bone marrow derived mesenchymal stem cells for repair of segmental bone defects in rabbits[J]. *Res Vet Sci*, 2013, 94(3): 743-752.
- [36] OKIZAKI S I, ITO Y, HOSONO K, et al. Vascular endothelial growth factor receptor Type1 signaling prevents delayed wound healing in diabetes by attenuating the production of IL-1 β by recruited macrophages[J]. *American Journal of Pathology*, 2016, 186(6): 1481-1498.
- [37] MCCOY R J, WIDAA A, WATTERS K M, et al. Orchestrating osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells-identification of placental growth factor as a mechanosensitive gene with a pro-osteogenic role[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(11): 2420-2431.
- [38] SHU C, SMITH S M, LITTLE C B, et al. Use of FGF-2 and FGF-18 to direct bone marrow stromal stem cells to chondro-

- genic and osteogenic lineages[J]. *Future Sci OA*, 2016, 2(4): 142.
- [39] KIM J M, SHIN H I, CHA S S, et al. DJ-1 promotes angiogenesis and osteogenesis by activating FGF receptor-1 signaling[J]. *Nat Commun*, 2012(3): 1296.
- [40] WALLNER C, SCHIRA J, WAGNER J M, et al. Application of VEGFA and FGF-9 enhances angiogenesis, osteogenesis and bone remodeling in type 2 diabetic long bone regeneration[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0118823.
- [41] BOYCE B F. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions[J]. *J Dent Res*, 2013, 92(10): 860-867.
- [42] ZHANG X, GUO J, WU G, et al. Effects of heterodimeric bone morphogenetic protein-2/7 on osteogenesis of human adipose-derived stem cells[J]. *Cell Prolif*, 2015, 48(6): 650-660.
- [43] MUTYABA P L, BELKIN N S, LOPAS L, et al. Notch signaling in mesenchymal stem cells harvested from geriatric mice [J]. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 2014, 28(4): 20-23.
- [44] 庞浩. 血管内皮祖细胞促进骨缺损修复重建的作用机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2013.
- [45] SEEBACH C, HENRICH D, WILHELM K, et al. Endothelial progenitor cells improve directly and indirectly early vascularization of mesenchymal stem cell-driven bone regeneration in a critical bone defect in rats [J]. *Cell Transplant*, 2012, 21(8): 1667-1677.
- [46] LIANG Y, WEN L, SHANG F, et al. Endothelial progenitors enhanced the osteogenic capacities of mesenchymal stem cells in vitro and in a rat alveolar bone defect model[J]. *Arch Oral Biol*, 2016, 68: 123-130.
- [47] 吴莉, 赵娴, 柯腾飞, 等. 自体内皮祖细胞促进组织工程骨血管化的体内外实验研究[J]. *重庆医学*, 2016(2): 159-163.
- [48] AMINI A R, LAURENCIN C T, NUKAVARAPU S P. Differential analysis of peripheral blood-and bone marrow-derived endothelial progenitor cells for enhanced vascularization in bone tissue engineering[J]. *J Orthop Res*, 2012, 30(9): 1507-1515.
- [49] ZIGDON-GILADI H, ELIMELECH R, MICHAELI-GELLER G, et al. Safety profile and long-term engraftment of human CD31 (+) blood progenitors in bone tissue engineering[J]. *Cytotherapy*, 2017, 19(7): 895-908.
- [50] BOUDIN E, FIJALKOWSKI I, HENDRICKX G, et al. Genetic control of bone mass[J]. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 2016(432): 3-13.
- [51] GUO X, WEI S, LU M, et al. Dose-dependent effects of strontium ranelate on ovariectomy rat bone marrow mesenchymal stem cells and human umbilical vein endothelial cells[J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(12): 1511-1522.

(王荣兵 编辑)