

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.15.009  
文章编号: 1005-8982 (2023) 15-0053-09

综述

## 核因子- $\kappa$ B影响骨折愈合细胞作用的研究进展\*

过丽强, 胡晓惠, 黄子裕, 赵永见, 赵东峰, 唐德志, 孙悦礼, 舒冰

[上海中医药大学脊柱病研究所 国家教育部重点实验室(筋骨理论与治法), 上海 200032]

**摘要:** 骨折是人类常见的大器官损伤, 从发生至完全愈合需数月甚至更长的时间, 若为严重骨折, 如粉碎性骨折、骨折骨坏死, 可发生延迟愈合甚至不愈合。骨折愈合受多种因素的影响, 在愈合过程中, 多种信号通路、细胞及细胞活性物质发挥重要作用。近年来研究发现, 核因子- $\kappa$ B调节多种细胞代谢, 影响骨折愈合过程的相关细胞增殖、分化、分泌活性物质等环节。该文综述在骨折愈合过程中核因子- $\kappa$ B影响骨折愈合细胞作用的研究进展, 为骨折愈合的治疗提供新的思路。

**关键词:** 骨折; 核因子- $\kappa$ B; 愈合; 细胞

**中图分类号:** R683

**文献标识码:** A

## Research progress of the effect of nuclear factor- $\kappa$ B on fracture healing cells\*

Guo Li-qiang, Hu Xiao-hui, Huang Zi-yu, Zhao Yong-jian, Zhao Dong-feng,  
Tang De-zhi, Sun Yue-li, Shu Bing

(Spine Institute, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Ministry of Education for Theory and Treatment of Bones and Muscles, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** Fracture is a common large organ injury in humans, it takes several months or more time to complete healing from the onset to the completion. If the fracture is more severe, it can occur with delayed healing or even non-healing such as comminuted fractures, fracture osteonecrosis. The fracture healing process is influenced by a variety of factors. During the fracture healing process, multiple signaling pathways, cells and cellular active substances play an important role in the healing process. Recent studies have revealed that nuclear factor- $\kappa$ B regulates a variety of cellular metabolism and affects several aspects of fracture healing process, including cell proliferation, differentiation, and secretion of active substances. This paper reviews the research progress of nuclear factor- $\kappa$ B acting on cells affecting fracture healing in the process of fracture healing from the cellular perspective respectively, and provides new ideas for the treatment of bone healing.

**Keywords:** fracture; NF-kappa B; wound healing; cell

骨折是人类最常见的大器官创伤性损伤。修复骨折是一个使受损的骨骼恢复到其受伤前的细胞组成、形态结构和生物力学功能的再生过程, 但约有 10% 的骨折不会正常愈合。骨折愈合经历血

肿形成、炎症反应、骨痂形成和骨重建等环节, 各个环节有不同的细胞参与其中, 如: 炎症细胞、血管内皮细胞、间充质干细胞、成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和破骨细胞等。其中, 众多的骨细胞系相关细

收稿日期: 2022-10-10

\* 基金项目: 国家重点研发计划(No:2018YFC1704300); 国家自然科学基金(No:81973876, No:81929004, No:82274555); 教育部创新团队发展计划(No:IRT1270); 科技部重点领域创新团队项目(No:2015RA4002)

[通信作者] 舒冰, E-mail: siren17721101@163.com; Tel: 13918570400

胞多由间充质干细胞及炎症细胞增殖分化产生。骨折后,周围的血管及骨髓破裂处形成血肿,包括血管内皮细胞的活化,中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞在内的免疫细胞浸润、分泌炎症和趋化因子、吞噬坏死组织、募集间充质干细胞到骨折部位。临时纤维蛋白形成纤维结缔组织,使骨折断端初步连接在一起,称为纤维性骨痂,或称暂时性骨痂。炎症消退后,募集的间充质干细胞主要分化为软骨细胞和成骨细胞,进入成骨过程,这些细胞合成软骨基质和成骨基质形成软骨痂,连接骨碎片,随后软骨痂中的软骨组织被清除,由骨组织组成的硬骨痂取代其位置。硬骨痂由破骨细胞和成骨细胞进一步重建,恢复骨的原始形状和功能。如骨缺损极小,骨折断端稳定,骨折局部的间充质干细胞直接分化为成骨细胞,进入膜内成骨过程,骨痂中的软骨形成极小<sup>[1]</sup>。核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)对骨折愈合具有重要作用。本文综述在骨折愈合过程中NF- $\kappa$ B影响骨折愈合细胞作用的研究进展。

## 1 NF- $\kappa$ B的生物学特性

NF- $\kappa$ B是一种转录因子,是一种典型的促炎信号传导途径。近年来,研究发现其广泛参与各种细胞代谢过程。哺乳动物中,NF- $\kappa$ B共有5个成员:RelA(p65)、RelB、c-Rel、前体蛋白NF- $\kappa$ B1(p105)和NF- $\kappa$ B2(p100),通过形成同二聚体和各种异二聚体结构存在于各种细胞中,其结构与逆转录病毒癌蛋白v-Rel具有同源性,N端上都有Rel同源结构域(Relhomology domain, RHD)。RHD由300个氨基酸构成,具有参与DNA结合和二聚化的作用,并与NF- $\kappa$ B抑制蛋白(I $\kappa$ B)紧密相关。其中3个成员p65、c-Rel和RelB被称为成熟蛋白,包含诱导靶基因表达的C末端转录激活域(trans-activating domain, TAD)。NF- $\kappa$ B1(p50)和NF- $\kappa$ B2(p52)由于缺乏C端TAD,虽然可以产生成熟的NF- $\kappa$ B亚基p50和p52,但p50和p52缺乏TAD,没有转录或充当转录阻遏物的能力,因此在细胞内以其前体p105和p100的形式进行转录<sup>[2-3]</sup>。

NF- $\kappa$ B在细胞中未被激活时,与I $\kappa$ B形成复合物稳定存在于胞质中。I $\kappa$ B蛋白由I $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\beta$ 、I $\kappa$ B $\epsilon$ 及前体NF- $\kappa$ B1(p105)和NF- $\kappa$ B2(p100)组成,

具有多个锚蛋白重复结构域,因此具有NF- $\kappa$ B二聚体结合的能力。外界刺激后,I $\kappa$ B被I $\kappa$ B激酶(IKK)磷酸化,IKK由IKK $\alpha$ (也称为IKK1)、IKK $\beta$ (也称为IKK2)和调节亚基NEMO 3个催化亚基组成,复合物水解形成游离的NF- $\kappa$ B,随后游离的NF- $\kappa$ B转移到细胞核中,与靶基因的启动子结合<sup>[4]</sup>。目前NF- $\kappa$ B的激活受两种途径调节(见图1):经典NF- $\kappa$ B激活途径通过IKK $\beta$ 调节,炎症细胞因子如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )或脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)激活IKK $\beta$ ,I $\kappa$ B在丝氨酸32和36处被活化的IKK磷酸化,主要被IKK $\beta$ 亚基磷酸化,被26S蛋白酶体降解,形成游离的NF- $\kappa$ B;非典型NF- $\kappa$ B的激活是基于p100的磷酸化,通过典型因子肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)家族成员的配体,诱导其在特定的C-末端丝氨酸残基(丝氨酸866和870)上的磷酸化,来加工产生NF- $\kappa$ B2 p52及相关的NF- $\kappa$ B成员的核移位,主要是RelB和NF- $\kappa$ B2(p52),后者通过募集E3泛素连接酶 $\beta$ TrCP来触发p100泛素化。NF- $\kappa$ B诱导激酶(NIK,也称为MAP3K14)是非典型NF- $\kappa$ B途径的一个中心信号成分,通过激活激酶IKK $\alpha$ 诱导p100磷酸化。与非典型NF- $\kappa$ B途径的快速激活不同,非经典NF- $\kappa$ B途径的激活具有缓慢性与持续性的特征。两种途径激活NF- $\kappa$ B后,可影响多种组织功能,如:淋巴系统的激活、B细胞存活和成熟、巨噬细胞活化和影响骨代谢相关细胞的活性,此外非经典NF- $\kappa$ B传导还与恶性肿瘤有关<sup>[5]</sup>。

## 2 NF- $\kappa$ B在调节骨折愈合中的作用

骨愈合过程中的炎症细胞激活,分泌细胞因子和凋亡,间充质干细胞的增殖分化,成骨细胞、软骨细胞的增殖促进骨形成及破骨细胞参与的骨重建过程都需要NF- $\kappa$ B传导<sup>[6]</sup>。当特异性抑制NF- $\kappa$ B时,以骨折愈合为例,血肿形成、炎症反应、骨痂形成和骨重建等都会受到影响,如:炎症细胞的持续激活延长急性炎症期,成骨细胞数目不足、成骨效率低下及破骨细胞的凋亡导致骨重建的延期等。影响骨折愈合的细胞作用及NF- $\kappa$ B的作用见表1<sup>[7]</sup>。

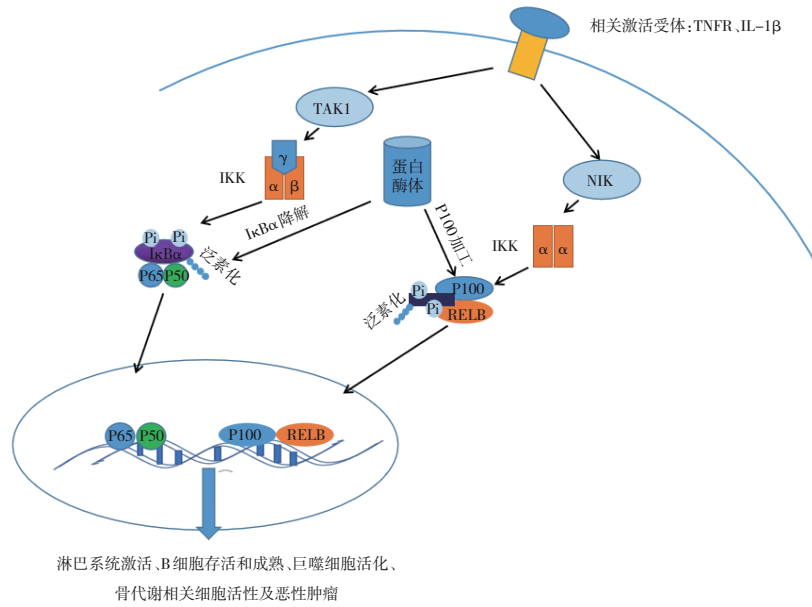


图 1 NF-κB 的两种激活途径

表 1 各种细胞在骨折愈合中的作用及 NF-κB 的作用

细胞类型	骨折愈合中的作用	NF-κB 的作用
炎症细胞	产生炎症, 分泌炎症因子, 诱导募集、增殖干细胞等	延长中性粒细胞寿命, 活化巨噬细胞
血管内皮细胞	分泌功能, 形成新生组织及血管等	调节促炎, 凝血反应, 细胞屏障渗透
间充质干细胞	干细胞增殖、分化, 形成成骨细胞、软骨细胞	募集干细胞
成骨细胞	骨基质的合成等	抑制成骨细胞分化
软骨细胞	分泌功能, 生长功能, 支撑功能等	诱导软骨细胞增殖、分化, 抑制细胞凋亡
脂肪细胞	分泌脂肪因子等	分泌细胞因子, 抑制骨形成
破骨细胞	骨吸收	诱导破骨细胞基因表达

### 2.1 NF-κB 与炎症细胞

骨折生成血肿后, 产生急性炎症, 血小板衍生因子、补体片段、坏死细胞及受损细胞外基质等信号吸引相关炎症细胞浸润, 其中浸润的炎症细胞主要有中性粒细胞和单核-巨噬细胞。

中性粒细胞是血液中含有最丰富的细胞, 骨髓释放后 24 ~ 48 h 内自发性细胞凋亡。NF-κB 调节中性粒细胞寿命及炎症的激活, 是中性粒细胞功能的核心, 在中性粒细胞中, NF-κB 显示出不同于其他白细胞亚群的独特表达模式。与其他白细胞亚群相比, 中性粒细胞表达激活方式存在差异, 未刺激的中性粒细胞 IκB 蛋白中 IκBα 与其他细胞不同, 不局限于细胞质中, 大量定位于细胞核, 核 IκBα 被认为是防止 NF-κB 激活的保护机制。中性粒细胞激活后, IKKβ 和 NEMO 在细胞质和细胞核中被磷酸化, IKKα 在细胞中消失, 随后

IκBα 降解和 RelA 在丝氨酸处的磷酸化, 促进 NF-κB 靶基因表达, 在激活的中性粒细胞中检测到 p50 (NFκB1)、p65 (RelA) 和/或 c-Rel 的功能性二聚体。TNF-α 和 LPS 对大多数刺激物通过 p50 和 RelA 触发 DNA 结合, 这一途径揭示了中性粒细胞中吞噬炎症因子的作用。进一步研究发现, 通过 TLR4 激动剂与 Toll 样受体 (toll-like receptors, TLR) 的结合可调节中性粒细胞中的 NF-κB 活性, 激活后的中性粒细胞发挥黏附作用主要由活化的 β2 整合素介导, 整合素结合或聚集促进了 NF-κB 活化增强促炎和抗凋亡基因表达。中性粒细胞附着时, β2 整合素可作为粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 和白细胞介素-8 (Interleukin-8, IL-8) 等细胞因子的共刺激信号来增强 NF-κB, 释放的过氧化物酶也可能与 CD11b/CD18 结合增强 NF-κB, 从而影响 NF-κB 的功

能<sup>[8]</sup>。凝血因子和衍生片段可通过激活 NF- $\kappa$ B 来延长中性粒细胞寿命。纤维蛋白原通过与 CD11b/CD18 分子结合触发 I $\kappa$ B $\alpha$  降解和 NF- $\kappa$ B 活化。凝血酶原加工过程中释放 F1 和 F2 提高中性粒细胞中的 NF- $\kappa$ B 转录活性。并且纤溶酶激活调节剂 (PAI-1 和 uPA) 可增强多形核细胞 (Polymorphonuclear, PMN) 炎症刺激的 NF- $\kappa$ B 激活反应<sup>[9]</sup>。此外, 活性氧系统 (reactive oxygen species, ROS) 与 NF- $\kappa$ B 活化的信号通路有关。在炎症部位产生的 ROS 影响一直受到广泛争论。有研究证明体内外 ROS 系统均可直接作为中性粒细胞的趋化剂, 中性粒细胞直接暴露于炎症因子中不会提高 NF- $\kappa$ B 活性, 相反过氧化氢消除了 LPS 或 TNF- $\alpha$  刺激的作用, 导致 I $\kappa$ B $\alpha$  降解和游离的 NF- $\kappa$ B 降低<sup>[10]</sup>。而在胞内 ROS 水平增加后, NF- $\kappa$ B 的促炎作用明显被抑制。由于炎症部位 NF- $\kappa$ B 活性的 ROS 调节比较复杂, 炎症部位其他细胞所分泌的一氧化氮、补体因子 C5a 和前列腺素 D2 也可抑制中性粒细胞中 NF- $\kappa$ B 活化, 所以在炎症部位, ROS 可能同时发挥促炎和抗炎的作用<sup>[11]</sup>。中性粒细胞凋亡主要依赖于 NF- $\kappa$ B 介导的抗凋亡基因如 Bcl-x(L)、A1 和 A20 的表达。人为增加 I $\kappa$ B $\alpha$  核积累或阻断 NF- $\kappa$ B 活化, 导致细胞凋亡加速, 相反, TNF- $\alpha$  对中性粒细胞的促炎导致 I $\kappa$ B $\alpha$  在胞质溶胶和细胞核中降解, 释放游离的 NF- $\kappa$ B 防止中性粒细胞凋亡, 这是通过 TNF- $\alpha$  激活 TNF 受体 1 (TNFR-1), 介导 PI3 激酶和 PKC- $\delta$  激活, 导致抗凋亡信号所需的 TNFR-1-TRADD-RIP-TRAF2 复合物组装, 并且凝血和纤维蛋白溶解作用于中性粒细胞的活化和延长细胞凋亡, 中性粒细胞表面整合素与纤维蛋白原的结合会激活 NF- $\kappa$ B 延迟细胞凋亡, 而凝血酶原片段的释放或 uPA/PAI-1 的激活同样会增强 NF- $\kappa$ B 的活性。虽然 NF- $\kappa$ B 诱导的抗凋亡调节因子, 但是抗凋亡调节因子如 A1 和 Mcl-1 的寿命较短, 因此持续激活 NF- $\kappa$ B, 保持 NF- $\kappa$ B 活跃, 促使中性粒细胞抑制凋亡<sup>[12]</sup>。单核-巨噬细胞是机体的免疫细胞, 具有抗感染等免疫调节作用。通常吞噬、呈递抗原是机体免疫防御中的重要细胞。骨折后, 骨折部位巨噬细胞聚集, 巨噬细胞中的 NF- $\kappa$ B 介导遵循非造血细胞中的中 NF- $\kappa$ B 传导的途径, 但是存在一定区别, NF- $\kappa$ B 二聚体中的 c-Rel 在巨噬细胞分泌细胞因子发挥重要作用, c-Rel 对巨噬细胞中

IL-12 (IL-12 p40) 的转录特别重要, 巨噬细胞中的转录选择性缺乏 c-Rel 时, 则不产生下游的 IL-12 (IL-12 p40) 相关 mRNA; 缺乏 c-Rel 和 p50 NF- $\kappa$ B 相关蛋白的小鼠对细菌的应答反应受损, 巨噬细胞将会缺乏吞噬作用和抗菌肽产生的功能<sup>[13]</sup>。而在活化巨噬细胞过程中, 活化的吞噬细胞中 NF- $\kappa$ B 受其他转录因子的调节。目前研究确定转录因子 Ikaros 支持 RelA 正反馈和 TNF 的产生, 在 Ikaros 缺陷细胞中, 持续的 NF- $\kappa$ B 染色质结合明显较少, 游离在细胞质中的活化 NF- $\kappa$ B 明显增多<sup>[14]</sup>。有研究通过荧光标记 RelA 与单细胞 RNA-seq 耦合进一步探讨巨噬细胞中 NF- $\kappa$ B 和转录控制之间的关系, 发现持久的核 RelA 信号与巨噬细胞分泌炎症因子基因表达升高相关, 这证明了巨噬细胞中细胞因子表达需要持续的 NF- $\kappa$ B 激活的刺激<sup>[15]</sup>。影响巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 激活还有其他因素, 包括不同受体的活性, 如干扰素或 TNF 两种细胞因子刺激巨噬细胞对 NF- $\kappa$ B 和 PRR 的刺激度存在区别。有趣的是, 活细菌和死细菌分别刺激巨噬细胞, 信号转导结果会发生显著变化。虽然这些研究并未专门针对 NF- $\kappa$ B 相关传导, 但是“vita-PAMP” (仅在活病原体中发现的 PAMP) 的变化与经典 NF- $\kappa$ B 途径存在关联<sup>[16]</sup>。

因此, 在骨折早期的炎症过程中, NF- $\kappa$ B 激活炎症细胞功能、抑制炎症细胞凋亡, 促使其发挥细胞功能, 为下一步骨修复的干细胞募集、增殖、分化奠定基础。

## 2.2 NF- $\kappa$ B 与血管内皮细胞

血管内皮细胞构成动脉、静脉和毛细血管的血管内衬, 与血液的成分和细胞直接接触。既是血液和组织之间的屏障, 又具有内分泌功能, 主要分泌一氧化氮、前列环素及前列腺素 E2, 由其组成的血管内皮控制血管舒张和收缩。NF- $\kappa$ B 在内皮细胞中起关键作用, 能够调节促炎、凝血反应、降低内皮细胞屏障功能引发组织外渗。TNF- $\alpha$  和凝血酶是内皮细胞中最强的 NF- $\kappa$ B 激活剂, 其他细胞因子如 I 型干扰素 IFN- $\gamma$  或 IL-1 $\beta$  也能激活细胞中的 NF- $\kappa$ B, 凝血酶与 G 偶联受体超家族成员 PAR-1 的细胞外末端结合, TNF- $\alpha$  与 TNFR-1 和 TNFR-2 结合, 结合后在 IKK 复合物的水平上汇聚, 激活 NF- $\kappa$ B<sup>[17-18]</sup>。两者具有协同作用, 但在内皮细胞中诱导活化 NF- $\kappa$ B 有不同的靶基因表达, 除了



细胞因子可以激活内皮细胞中的 NF- $\kappa$ B, 还可以通过剪切应力激活, 比如: 湍流血流等。TZIMA 等<sup>[19]</sup>研究发现, 血小板内皮细胞黏附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1) 与血管内皮细胞钙黏蛋白和 VEGFR-2 形成一种机械感觉复合物, 这一复合物具有流动反应性, 特异性敲除 PECAM-1 后, 血流受干扰的区域则不会激活 NF- $\kappa$ B, 这种机械传感途径是已知的动脉粥样硬化形成的一种机制。内皮细胞通过抗凝血酶 III 与内皮表面的结合等途径调节凝血和纤维蛋白溶解之间的平衡, 通过抗降解形式的 I $\kappa$ B $\alpha$  的转基因表达选择性阻断 NF- $\kappa$ B, 导致内皮通透性降低、中性粒细胞浸润减少和凝血酶-抗凝血酶复合物水平降低, 阻断 NF- $\kappa$ B 并且抑制血栓调节蛋白-EPCR 抗凝途径<sup>[20]</sup>。NF- $\kappa$ B 通过 TLR 和其他 NF- $\kappa$ B 激活剂与细胞膜融合, 如 CD40L 激活后特定分泌 Weibel-Palade 小体 (WPB), WPB 小体包裹几种蛋白质, 如凝血因子 VIII、vWF 或 P-选择素。P-选择素在 WPB 与细胞膜融合后暴露于内皮细胞表面, 提高黏附功能<sup>[21]</sup>。研究发现, 阻断 NF- $\kappa$ B 的活化可促进骨折愈合的进展, 黄芪甲苷通过抑制 NF- $\kappa$ B 的活性进而抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统中的血管紧张素 II 所诱发的血管内皮细胞介导的炎症反应, 影响骨折愈合的进展<sup>[22]</sup>。

### 2.3 NF- $\kappa$ B 与间充质干细胞及分化细胞

间充质干细胞是一种多能干细胞, 具有干细胞的所有共性, 即自我更新和分化能力, 可以分化为成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞和成肌细胞, 并在增殖 20 ~ 30 代后仍保持多重分化潜力。骨折后, 骨髓中的间充质干细胞增殖、分化形成成骨细胞和成软骨细胞。早期 TNF- $\alpha$  刺激后, 动员骨髓、外周血和周围组织中的间充质干细胞, 启动间充质干细胞的募集, 这一过程中 TNF- $\alpha$  通过 NF- $\kappa$ B 核转位介导的细胞周期蛋白 D1 的激活刺激间充质干细胞的细胞增殖。这一过程 NF- $\kappa$ B 是通过激活 IKK-2 来调节的, IKK-2 作为活化 NF- $\kappa$ B 的关键调节酶, 激活后可以提高间充质干细胞中基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase, MMP-9) 的表达, 进而 MMP-9 的蛋白水解活性形式与细胞表面的 CD44 结合。CD44 和 MMP-9 存在于细胞膜上, 可介导 IV 型胶原降解并促进细胞的聚集<sup>[23]</sup>。并且炎症因子已被

证明通过激活 IKK-2 和典型的 NF- $\kappa$ B 途径增加干细胞的增殖。成骨细胞来源于间充质干细胞, 主要负责骨基质的合成, 是骨形成的主要功能细胞。间充质干细胞表达包括骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 和 Wingless (Wnt) 通路成员, 激活 Runx2 的表达。Runx2 是成骨细胞分化的主基因, 随后可上调成骨细胞相关基因, 如 Col1A1、ALP、BSP、BGLAP 和 OCN<sup>[24]</sup>。NF- $\kappa$ B 传导在成骨过程中的抑制作用是通过使用在分化的成骨细胞中表达显性失活形式的 IKK $\gamma$  的转基因小鼠来证明, 通过骨钙素启动子控制的。研究表明, 成骨细胞中 NF- $\kappa$ B 活性的抑制增加了年轻 (2 ~ 4 周龄) 小鼠的骨小梁质量和骨矿物质密度, 而不影响成骨功能, 通过小分子抑制剂或基因缺失抑制 IKK $\gamma$  在基础水平或者存在 TNF- $\alpha$  或 IL-17 的情况下增加了成骨能力。在小鼠颅骨缺损模型中, 局部施用 IKK $\gamma$  抑制剂可增强骨修复, NF- $\kappa$ B 激活诱导了 Smurf 1/2 (一种控制  $\beta$ -连环蛋白降解的泛素连接酶) 的表达, 并抑制了成骨分化<sup>[25]</sup>。并且有研究发现, TNF- $\alpha$  直接注射到野生小鼠中会降低间充质干细胞的成骨分化, 10 ng/mL TNF- $\alpha$  通过抑制 Runx2 表达有效地抑制成骨, 这证明了在骨折早期大量炎症因子的释放能有效抑制成骨分化<sup>[26]</sup>。WANG 等<sup>[27]</sup>通过研究证明 TNF- $\alpha$  通过抑制 EphrinB2-fc 抑制间充质干细胞 EphB4 信号通路的表达, 同时从基因和蛋白水平抑制 Runx2、ALP 活性和矿物结节的形成, 抑制成骨分化。成熟的成骨细胞中 NF- $\kappa$ B 是活跃的, MISHRA 等<sup>[28]</sup>研究发现 NF- $\kappa$ B 在成骨细胞中自动作用于细胞, 抑制其去分化, 而特异性抑制 NF- $\kappa$ B 后, 提高细胞的去分化, 分化成熟的成骨细胞去分化形成成骨细胞祖细胞, 这种细胞仍然可以分化为成骨细胞, 但是无法分化为其他细胞。这些研究结果证明在骨折早期, 炎症因子的释放会抑制成骨细胞的分化。成骨细胞凋亡和自噬发生可以减少的后期骨重建和修复, TNF- $\alpha$  可以通过激活 NF- $\kappa$ B、提高  $\kappa$ B $\alpha$  和 P105 的磷酸化、在成熟的成骨细胞中诱导其自噬和凋亡的下游基因表达, 提高成骨细胞凋亡率<sup>[29]</sup>。

软骨细胞始于间充质细胞的凝结, 炎症期后, 间充质干细胞分化为软骨细胞, 这一过程包括软骨细胞增殖、肥大和凋亡, 并且研究发现 NF- $\kappa$ B

参与软骨内骨化和肢体生长<sup>[30]</sup>。研究发现,p65在培养的软骨细胞中过表达诱导软骨细胞增殖和分化,并通过增加BMP2表达来抑制细胞凋亡;使用p65 siRNA抑制NF- $\kappa$ B传导可减少软骨细胞增殖和分化,并通过抑制BMP2表达增加软骨细胞凋亡;BMP2基因的启动子区域有2个特定的NF- $\kappa$ B反应部位,这可作用于软骨细胞,NF- $\kappa$ B通过这些部位诱导BMP2表达,特异性双敲除NF- $\kappa$ B1和NF- $\kappa$ B2后的小鼠软骨细胞增殖显著降低,出现新生鼠的生长板软骨发育不良,这一过程证明BMP2在软骨分化的最初诱导了NF- $\kappa$ B的瞬时激活,而p65 siRNA抑制BMP2诱导软骨细胞分化下游的Sox9特异性基因的表达<sup>[31-32]</sup>。在骨生长中,磷酸化的NF- $\kappa$ B2和RelB在关节周围区的软骨细胞的细胞核中被发现,证明NF- $\kappa$ B可以在关节周围被激活促进生长板区的发育,当特异性切除NF- $\kappa$ B2的C末端锚蛋白重复序列的纯合基因后,导致p52/RelB复合物的DNA结合活性在骨组织中被显著激活,表现为长骨的发育不良<sup>[32]</sup>。中药组分黄芩苷即可通过NF- $\kappa$ B信号通路抑制IL-1 $\beta$ 诱导的软骨细胞外基质降解,维护软骨细胞的正常功能及结构<sup>[33]</sup>。

脂肪细胞大量存在于人体的各个组织中,分为白色和棕色脂肪细胞两大类,其形态、功能和来源方有差异。骨髓脂肪细胞则是由间充质干细胞分化所得,可负向调控成骨过程,与低骨密度密切相关,骨髓脂肪细胞较多可影响骨组织的连续性与稳定性,严重时甚至发生自发性骨折。骨髓脂肪细胞的功能与成骨分化及造血有关,间充质干细胞向骨髓脂肪细胞的分化抑制间充质干细胞向成骨细胞分化,并且骨髓脂肪细胞刺激破骨细胞的分化和活性进而引起骨量减少<sup>[34]</sup>。研究<sup>[35]</sup>发现,骨髓脂肪细胞可促进NF- $\kappa$ B受体激活因子的分泌从而增加破骨过程及骨的重吸收。有趣的是,脂肪因子瘦素,作为调节脂肪组织负反馈回路的一部分,与骨骼表面存在的瘦素受体结合后,可以增加成骨细胞和软骨细胞的增殖分化,抑制NF- $\kappa$ B受体活化因子配体(RANKL)的表达和诱导骨保护素减少破骨细胞,促进骨折愈合的加快<sup>[36]</sup>。

#### 2.4 NF- $\kappa$ B与破骨细胞

破骨细胞是起源于单核-巨噬细胞,发挥骨吸收功能的一种特殊的终末分化细胞,在骨重建中作

为骨组织成分的一种,行使骨吸收的功能。主要由单核前体细胞通过多种方式融合形成巨大的多核细胞而形成破骨细胞。破骨细胞分化由RANKL和M-CSF受体激活剂的刺激引发的,因此,在破骨细胞发挥骨重建时,NF- $\kappa$ B发挥重要功能<sup>[37]</sup>。研究发现,NF- $\kappa$ B与RANKL受体RANK结合,激活下游信号通路,诱导破骨细胞相关基因表达,RANKL通过赖氨酸63(Lys63)上TNF受体相关因子6( TRAF6)的多泛素化,随后激活NF- $\kappa$ B IKK的磷酸化、I $\kappa$ B的降解、NF- $\kappa$ B/Rel复合物的磷酸化和P65的核转位<sup>[38]</sup>。在激活过程中产生ROS,产生的ROS激活下游参与破骨细胞生成NF- $\kappa$ B,这是一个循环递进、层层累加的过程<sup>[39]</sup>。TAN等<sup>[40]</sup>发现特异性抑制RANKL下游的NFATc1表达,并不抑制TRAF6或c-fos的表达,但NFATc1表达的降低会对破骨细胞生成产生抑制作用,表明NF- $\kappa$ B抑制通过下调NFATc1来抑制破骨细胞的发生。有研究使用二邻苯二酚(DPHC)证明了抑制NFATc1的表达来减弱RANKL诱导破骨细胞分化的过程是通过抑制I $\kappa$ B和p65磷酸化来实现的,这些验证了NF- $\kappa$ B在破骨细胞生成、分化中的重要作用<sup>[41]</sup>。RAW264.7细胞中硫酸化支链淀粉通过抑制RANKL诱导胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)的激活、抑制I $\kappa$ B $\alpha$ 的降解来抑制RANKL诱导的破骨细胞的形成;茜草素-1-甲基醚抑制RANKL诱导的破骨细胞产生和破骨细胞肌动蛋白环的形成<sup>[42]</sup>。研究发现,IKK依赖的NF- $\kappa$ B在小鼠体内可以将p65同源二聚体与c-fos启动子的结合和Elk-1激活协调调节小鼠c-Fos转录,并且单独激活NF- $\kappa$ B不足以诱导c-Fos,需要足够的ERK介导的Elk-1和CREB磷酸化,证明了NF- $\kappa$ B激活与c-Fos诱导有关,但是这种结合位点仅在小鼠体内得以证明,人类目前未检测到c-Fos的NF- $\kappa$ B相关启动子<sup>[43-44]</sup>。

RANKL由各种细胞产生,成骨细胞、成骨细胞、T细胞和B细胞均表达。缺乏RANKL及其受体RANK的小鼠由于完全缺乏破骨细胞可出现石骨症。另外,缺乏RANKL诱导受体骨钙素的小鼠破骨细胞数量增加,导致骨质疏松症<sup>[45]</sup>。TNF受体激活因子(TRAF)下游的转录因子NF- $\kappa$ B中,同时敲除NF- $\kappa$ B1和NF- $\kappa$ B2的小鼠完全缺乏破骨细胞,存在石骨症,但单独缺失NF- $\kappa$ B1或NF- $\kappa$ B2均不会导致

相关症状, NF- $\kappa$ B 的 5 种家族分子中, 无法分析 IKK $\beta$  和 NEMO 的骨表型, 因为这些分子是胚胎致死, 为了使 IKK $\beta$  在骨髓细胞中特异性缺乏, 杂交小鼠, 产生骨髓细胞中 IKK $\beta$  特异性缺乏的条件敲除小鼠, 检测后由于破骨细胞数量减少, 小鼠显示出骨小梁体积增加; 此外, 破骨细胞前体细胞的数量也减少<sup>[46]</sup>。因此其他细胞的 RANKL 缺失也会影响到破骨细胞的活性及功能。

### 3 展望

在骨折愈合过程中, 炎症细胞如中性粒细胞、单核-巨噬细胞发挥炎症作用、随后募集间充质干细胞增殖分化为成骨细胞、软骨细胞及骨重塑中的破骨细胞, 这些细胞各个功能均需要 NF- $\kappa$ B 的作用。

研究证明, 中药有效组分对不同细胞中 NF- $\kappa$ B 的表达存在不同的作用。CHEN 等<sup>[47]</sup>发现中药五味子的有效成分五味子素 B 通过调节 NF- $\kappa$ B 减轻特异性免疫球蛋白(Ig)E 水平, 从而减轻哮喘症状, 哮喘发病过程中, 活性氧、过氧化氢酶、谷胱甘肽, 过氧化物酶、超氧化物歧化酶、一氧化氮和丙二醛等炎症细胞因子失衡, 炎症细胞因子产生激活作用, 与 NF- $\kappa$ B 结合的 I $\kappa$ B $\alpha$  被 I $\kappa$ B $\alpha$  激酶迅速磷酸化, 磷酸化的  $\kappa$ B $\alpha$  被蛋白酶体降解, 释放 NF- $\kappa$ B 的独立二聚体, 所释放的 NF- $\kappa$ B 独立二聚体被运送到细胞核, 并引起各种靶基因的转录, 从而应激性地提高炎症反应, 因此, 中药五味子的有效成分五味子素 B 抑制 NF- $\kappa$ B 的激活被认为是呼吸系统疾病哮喘的潜在治疗手段。PRANGSAENGTONG 等<sup>[48]</sup>证明紫草有效组分紫草素显著抑制淋巴内皮细胞的分化能力, 抑制了 NF- $\kappa$ B 的活化功能, 降低 NF- $\kappa$ B 活化后的 p65 的磷酸化和核转位, 使用 NF- $\kappa$ B 抑制剂 (bay11-7085) 和 HIF-1 $\alpha$  小干扰 RNA (siRNA) 转染后发现, 这一途径是通过抑制 NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$  轴抑制淋巴细胞生成。

目前已经证实中医药通过 NF- $\kappa$ B 通路治疗众多疾病, 但对骨折愈合过程中相关细胞影响的报道较少。有研究表明, 姜黄素通过阻断软骨细胞中 B 细胞的 NF- $\kappa$ B 轻链增强子的活化和防止 B 细胞抑制剂  $\alpha$  中 NF- $\kappa$ B 轻多肽基因增强子的活化, 实现磷酸化和 NF- $\kappa$ B 复合物 p65 亚基向细胞核的移位, 进

而抑制 NF- $\kappa$ B 的易位从而阻止软骨细胞的炎症反应<sup>[49]</sup>。因此 NF- $\kappa$ B 是骨折愈合研究的潜在创新。随着骨修复研究的深入, 发现 NF- $\kappa$ B 参与调节骨折愈合过程中多种细胞过程, 如破骨细胞和成骨细胞相互作用, 从而能够在骨重塑过程中达到一个稳定的平衡, 完成骨折愈合过程。明确 NF- $\kappa$ B 在骨折过程中相关不同细胞、不同状态下的作用机制, 对从 NF- $\kappa$ B 角度开发新的促进骨折愈合的药物和干预方案具有重要作用。

### 参 考 文 献 :

- [1] ONO T, TAKAYANAGI H. Osteoimmunology in bone fracture healing[J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2017, 15(4): 367-375.
- [2] YU H, LIN L B, ZHANG Z Q, et al. Targeting NF- $\kappa$ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 209.
- [3] BARNABEI L, LAPLANTINE E, MBONGO W, et al. NF- $\kappa$ B: at the borders of autoimmunity and inflammation[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 716469.
- [4] MULERO M C, HUXFORD T, GHOSH G. NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, and IKK: integral components of immune system signaling[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1172: 207-226.
- [5] SUN S C. The non-canonical NF- $\kappa$ B pathway in immunity and inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(9): 545-558.
- [6] BOYCE B F, LI J B, XING L P, et al. Bone remodeling and the role of TRAF3 in osteoclastic bone resorption[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2263.
- [7] VALLANCE T M, SHEARD J J, MENG Y M, et al. Development and characterization of a novel, megakaryocyte NF- $\kappa$ B reporter cell line for investigating inflammatory responses[J]. *J Thromb Haemost*, 2021, 19(1): 107-120.
- [8] MUSSBACHER M, SALZMANN M, BROSTJAN C, et al. Cell type-specific roles of NF- $\kappa$ B linking inflammation and thrombosis[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 85.
- [9] NOSEYKINA E M, SCHEPETKIN I A, ATOCHIN D N. Molecular mechanisms for regulation of neutrophil apoptosis under normal and pathological conditions[J]. *J Evol Biochem Physiol*, 2021, 57(3): 429-450.
- [10] KASHYAP T, ARGUETA C, ABOUKAMEEL A, et al. Selinexor, a selective inhibitor of nuclear export (SINE) compound, acts through NF- $\kappa$ B deactivation and combines with proteasome inhibitors to synergistically induce tumor cell death[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(48): 78883-78895.
- [11] REYES-QUIROZ M E, ALBA G, SÁENZ J, et al. Platelet-activating factor and hydrogen peroxide exert a dual modulatory effect on the transcription of LXR $\alpha$  and its target genes in human neutrophils[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 38: 357-366.



- [12] HAMDOUN S, EFFERTH T. Ginkgolic acids inhibit migration in breast cancer cells by inhibition of NEMO sumoylation and NF- $\kappa$ B activity[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(21): 35103-35115.
- [13] DORRINGTON M G, FRASER I D C. NF- $\kappa$ B signaling in macrophages: dynamics, crosstalk, and signal integration[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 705.
- [14] OH K S, GOTTSCHALK R A, LOUNSBURY N W, et al. Dual roles for Ikaros in regulation of macrophage chromatin state and inflammatory gene expression[J]. *J Immunol*, 2018, 201(2): 757-771.
- [15] LANE K, van VALEN D, DEFELICE M M, et al. Measuring signaling and RNA-Seq in the same cell links gene expression to dynamic patterns of NF- $\kappa$ B activation[J]. *Cell Syst*, 2017, 4(4): 458-469.e5.
- [16] BARBET G, SANDER L E, GESWELL M, et al. Sensing microbial viability through bacterial RNA augments T follicular helper cell and antibody responses[J]. *Immunity*, 2018, 48(3): 584-598.e5.
- [17] ARAKAKI A K S, PAN W A, TREJO J. GPCRs in cancer: protease-activated receptors, endocytic adaptors and signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 1886.
- [18] SHEN J, XIAO Z G, ZHAO Q J, et al. Anti-cancer therapy with TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ : a comprehensive review[J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(4): e12441.
- [19] TZIMA E, IRANI-TEHRANI M, KIOSSES W B, et al. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress[J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 426-431.
- [20] GOCHER A M, WORKMAN C J, VIGNALI D A A. Interferon- $\gamma$ : teammate or opponent in the tumour microenvironment? [J]. *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(3): 158-172.
- [21] van HINSBERGH V W M. Endothelium—role in regulation of coagulation and inflammation[J]. *Semin Immunopathol*, 2012, 34(1): 93-106.
- [22] 张诗雨, 孙阳, 张静, 等. 黄芩甲苷对 angiotensin II 诱发的血管内皮细胞炎症反应的影响及机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(21): 5900-5907.
- [23] BAI X, XI J, BI Y W, et al. TNF- $\alpha$  promotes survival and migration of MSCs under oxidative stress *via* NF- $\kappa$ B pathway to attenuate intimal hyperplasia in vein grafts[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(9): 2077-2091.
- [24] FLORENCIO-SILVA R, SASSO G R D S, SASSO-CERRI E, et al. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 421746.
- [25] JIMI E, KATAGIRI T. Critical roles of NF- $\kappa$ B signaling molecules in bone metabolism revealed by genetic mutations in osteopetrosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(14): 7995.
- [26] ZHAO Z J, HOU X D, YIN X X, et al. TNF induction of NF- $\kappa$ B RelB enhances RANKL-induced osteoclastogenesis by promoting inflammatory macrophage differentiation but also limits it through suppression of NFATc1 expression[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135728.
- [27] WANG L M, ZHAO N, ZHANG J, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits osteogenic differentiation of pre-osteoblasts by downregulation of EphB4 signaling via activated nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *J Periodontol Res*, 2018, 53(1): 66-72.
- [28] MISHRA R, SEHRING I, CEDERLUND M, et al. NF- $\kappa$ B signaling negatively regulates osteoblast dedifferentiation during zebrafish bone regeneration[J]. *Dev Cell*, 2020, 52(2): 167-182.e7.
- [29] ZHENG L W, WANG W C, MAO X Z, et al. TNF- $\alpha$  regulates the early development of avascular necrosis of the femoral head by mediating osteoblast autophagy and apoptosis via the p38 MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(9): 1881-1889.
- [30] JIMI E, FEI H, NAKATOMI C. NF- $\kappa$ B signaling regulates physiological and pathological chondrogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6275.
- [31] de LUCA F. Regulatory role of NF- $\kappa$ B in growth plate chondrogenesis and its functional interaction with growth hormone[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, 514: 110916.
- [32] NAKATOMI C, NAKATOMI M, MATSUBARA T, et al. Constitutive activation of the alternative NF- $\kappa$ B pathway disturbs endochondral ossification[J]. *Bone*, 2019, 121: 29-41.
- [33] YANG H, WANG Z T, WANG L H, et al. Scutellarin ameliorates osteoarthritis by protecting chondrocytes and subchondral bone microstructure by inactivating NF- $\kappa$ B/MAPK signal transduction[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155: 113781.
- [34] 乔雪松, 陈霓, 杨风英, 等. 运动调控间充质干细胞来源骨髓脂肪细胞的作用及前景[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(8): 1293-1298.
- [35] SEBO Z L, RENDINA-RUEDY E, ABLES G P, et al. Bone marrow adiposity: basic and clinical implications[J]. *Endocr Rev*, 2019, 40(5): 1187-1206.
- [36] 康思凤, 汤光宇. 脂肪组织与骨质疏松相关性及其机制的研究进展[J]. *国际医学放射学杂志*, 2018, 41(1): 72-76.
- [37] PARK J H, LEE N K, LEE S Y. Current understanding of RANK signaling in osteoclast differentiation and maturation[J]. *Mol Cells*, 2017, 40(10): 706-713.
- [38] QUINN J M, HORWOOD N J, ELLIOTT J, et al. Fibroblastic stromal cells express receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand and support osteoclast differentiation[J]. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(8): 1459-1466.
- [39] WANG X, CHEN B, SUN J Y, et al. Iron-induced oxidative stress stimulates osteoclast differentiation *via* NF- $\kappa$ B signaling pathway in mouse model[J]. *Metabolism*, 2018, 83: 167-176.
- [40] TAN Y H, KE M H, LI Z C, et al. A nitrobenzoyl sesquiterpenoid insulicolid A prevents osteoclast formation *via* suppressing c-Fos-NFATc1 signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 12: 753240.



- [41] IHN H J, KIM J A, CHO H S, et al. Diphlorethohydroxycarmalol from *Ishige okamurae* suppresses osteoclast differentiation by downregulating the NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): 2635.
- [42] HE Y Q, ZHANG Q, SHEN Y, et al. Rubiadin-1-methyl ether from *Morinda officinalis* How. Inhibits osteoclastogenesis through blocking RANKL-induced NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 506(4): 927-931.
- [43] TU Y C, HUANG D Y, SHIAH S G, et al. Regulation of c-Fos gene expression by NF- $\kappa$ B: a p65 homodimer binding site in mouse embryonic fibroblasts but not human HEK293 cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e84062.
- [44] 陈城, 方建平, 王滢, 等. 硫酸化支链淀粉抑制 RANKL 诱导破骨细胞的形成及其作用机制[J]. *中国新药杂志*, 2014, 23(1): 25-31.
- [45] DARNAY B G, HARIDAS V, NI J, et al. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappab and c-Jun N-terminal kinase[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(32): 20551-20555.
- [46] JIMI E, TAKAKURA N, HIURA F, et al. The role of NF- $\kappa$ B in physiological bone development and inflammatory bone diseases: is NF- $\kappa$ B inhibition "killing two birds with one stone"?[J]. *Cells*, 2019, 8(12): 1636.
- [47] CHEN Y Q, KONG Y, WANG Q L, et al. Schisandrin B attenuates airway inflammation by regulating the NF- $\kappa$ B/Nrf2 signaling pathway in mouse models of asthma[J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021: 8029963.
- [48] PRANGSAENGTONG O, JANTAREE P, LIRDPRAPAMONGKOL K, et al. Shikonin suppresses lymphangiogenesis via NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$  axis inhibition[J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(11): 1659-1666.
- [49] 杨青坡, 穆合塔尔·买买提热夏提, 王法正, 等. 姜黄素联合有氧运动对骨质疏松大鼠骨密度、氧化应激能力及骨组织 NF- $\kappa$ B 的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(1): 55-59.  
(张蕾 编辑)

**本文引用格式:** 过丽强, 胡晓惠, 黄子裕, 等. 核因子- $\kappa$ B 影响骨折愈合细胞作用的研究进展[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(15): 53-61.

**Cite this article as:** GUO L Q, HU X H, HUANG Z Y, et al. Research progress of the effect of nuclear factor- $\kappa$ B on fracture healing cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(15): 53-61.