

第二章 肢体再生的生物学基础与进展

再生是人类的梦想，医学领域的最高境界，再生医学成为 20 世纪 90 年代来，医学领域最为热门的课题。肢体再生是“再生医学”的重要组成部分，骨外固定的核心理论之一。现今，肢体再生并非科幻故事，在骨外固定条件下已成为现实。肢体再生的最新研究证明：现今的骨外固定生物学理论，亦非局限于骨折愈合或牵拉成骨的组织学层面，而己是建立在肢体全部、部分或单一组织在损伤或应力环境下，激活细胞内信号转导（cellular signal transduction）系统，呈现原始生长发育的生物学功能过程。为了使读者了解肢体再生与骨外固定原理和临床实践的关联性，作者根据近年来的学习、理解和研究总结，就肢体再生的生物学基础研究进展简述如下。

第一节 骨的发育与形成

一、骨的发育

骨骼和肌肉是由胚胎的中胚层分化而来，其中包括骨骼、关节、肌肉、肌腱和韧带等软组织。骨骼和肌肉损伤和疾病是人类最常见的病症之一。当损伤之后，骨骼和肌肉会进行修复。但是，非多发骨折或者外科手术造成的骨骼间隙、大范围损伤或者手术造成的肌肉间隙则被瘢痕组织填充。关节软骨和关节半月板修复能力较弱，主要依靠纤维软骨瘢痕组织将其修复。肌腱和韧带的修复主要是依靠形成类似于原始组织的瘢痕，但是其强度有所下降。在这一节中，我们将讨论和回顾肢体组织的修复的生物学机理。

（一）骨的胚胎起源 骨由围绕着骨细胞的和坚韧的及高度钙化的有机基质构成。所有脊椎动物的骨组织均起源于三胚层结构的外胚层或中胚层。头面部骨组织起源于被称作“神经嵴”的外胚层间充质细胞。神经胚形成过程中，神经嵴细胞出现并沿神经管的背侧缘分布，然后迁移发育而成。长骨有几部分组成。骨的较长部分为圆柱形骨干，骨干的两侧为干骨后端，并有盘状骨骺被关节软骨包裹。图 1 介绍了骨干区的结构。圆柱状骨干的外部由密致皮质或密实骨组成，并在骨骺和干骨后端渐渐变薄。骨细胞被埋在小腔内，形成围绕血管的同心圆，形成 Haversian 系统，或骨单位。骨细胞之间联系紧密，并骨内膜、外膜相交通，并在骨质中的小管内形成网络。在密实骨内部有薄的骨小梁。此小梁骨看似海绵常被称作海绵骨。小梁间的空间和骨干的髓腔相连。

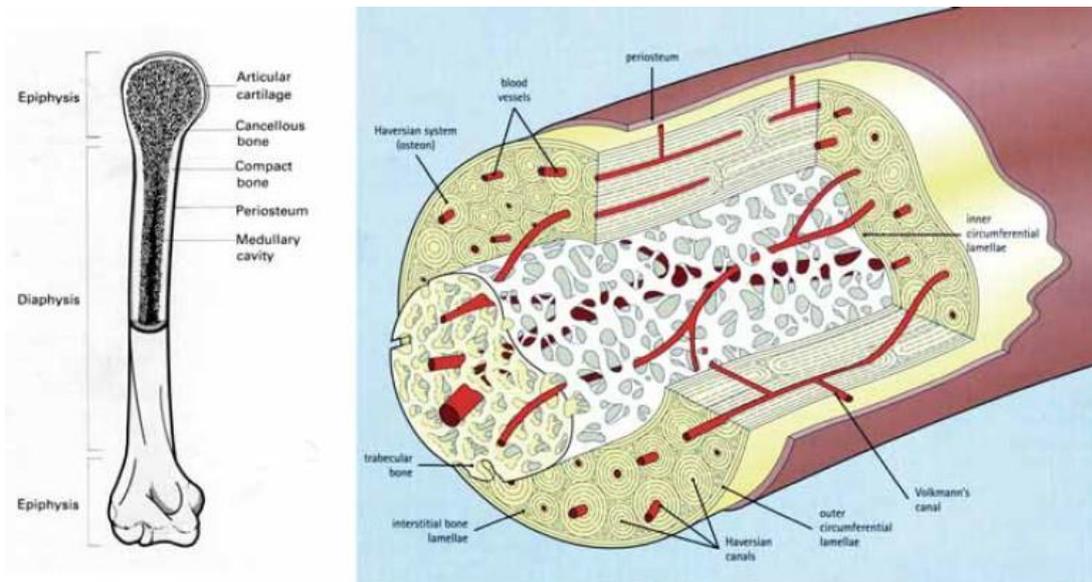


图 1. 软骨内骨化的结构。A 长骨切开。骨由骨干、骺端、2 个头端和有软骨覆盖的骺组成。骨髓腔被海面骨覆盖。海面骨被密实骨包绕，并被骨周围膜包绕外层。B 干骺端的内部结构。密实骨包含内层和外层环状的板层，再其间有哈佛系统，或叫骨单元，有同心骨环围绕中心内哈佛管组成。血管在哈佛管内横行穿越，在福克曼管中纵行穿过。在骨单元之间是骨髓的间质板。

髓腔与骨膜下结缔组织相连并填充骨髓腔。成纤维细胞、间充质干细 (Mesenchymal stem cells, MSCs)、前造骨细胞和造骨细胞组成骨内膜，而骨髓有间质干细胞、成纤维细胞、脂肪细胞、巨噬细胞和内皮细胞组成。这些细胞，与骨内膜结缔组织层，组成骨髓基质。埋藏于基质内，并依赖于其生存的是造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 和内皮干细胞 (endothelial stem cells, EnSCs)。骨的外层有另一层结缔组织层覆盖，称作骨周围膜。骨周围膜和Haversian管也包含MSCs、前成骨细胞和成骨细胞。90%骨基质的有机物质为胶原蛋白，另外10%有各种糖蛋白和蛋白多糖组成。在有机基质中散在的是羟磷灰石晶体，为骨基质提供强度。

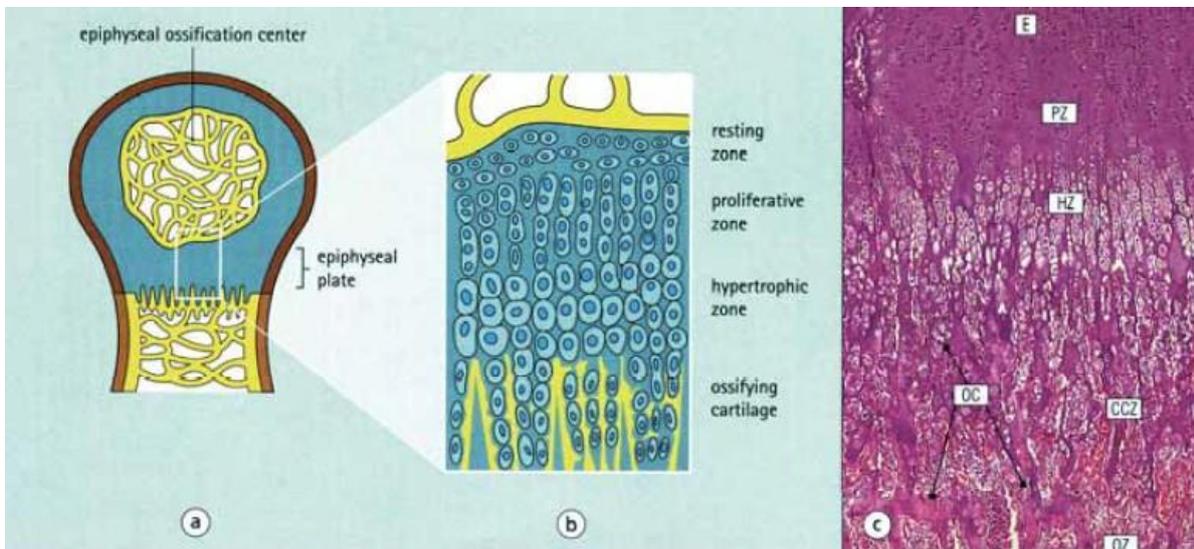
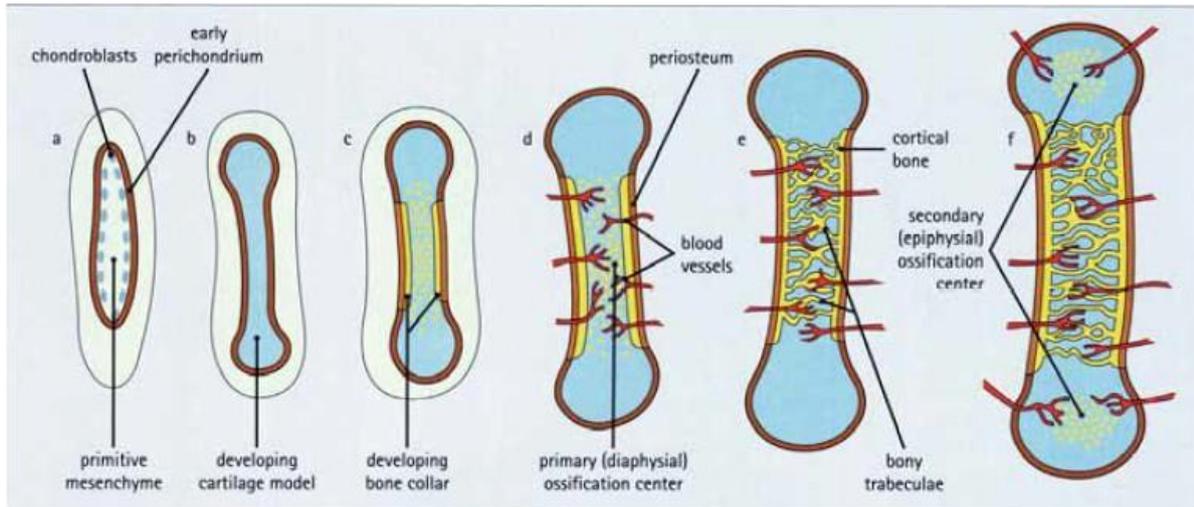


图 2. 软骨内成骨发育。上：(a) 当成软骨细胞被早期软骨周围膜包绕后，间质细胞浓缩并分化，使其成为骨周围膜。(b, c) 软骨板形成从中心向骨端。密实骨的骨周围膜形成于软骨板周围的骨周围膜。(d, e, f) 软骨细胞增生，软骨基质钙化，骨周围膜骨和钙化的骨基质被血管穿透，相关的间质细胞和造血干细胞分化为成骨细胞形成骨小梁和骨髓基质。下：生长板的发育在干骨后端和骨干间。(a, b) 骨化软骨存在于的骺段和骨干并在其间有生长板。在生长板内的软骨细胞层表现为进行性的骨取代软骨。幼软骨细胞仔静止层，在他们下方是增生的软骨细胞填充增生层。在增生层下方，成骨细胞取代软骨细胞。(c) 未钙化的生长板的低度的组织学切片。E=静止的软骨细胞，PZ=增生区，HZ=增大区，CCZ=钙化软骨和软骨钙化板 OC 延伸自骨化区 OZ。

扁平骨，如颅骨，在胚胎发生时通过 MSCs 分化成成骨细胞而来的，这一过程被称为膜内骨形成。长

骨表现出软骨内生长，如骨的钙化过程中软骨板首先形成，后被骨替代。软骨内成骨的发展阶段如图 2 所示。间质干细胞浓缩和分化成软骨细胞，从中心开始。软骨细胞分化向骨的两侧进展，形成软骨板。包绕软骨板的骨周围膜细胞分化为成骨细胞并形成突向骨端的一层骨板。随着进展，软骨细胞增生并凋亡，释放血管源性信号引发骨周围膜的毛细血管形成，同时破骨细胞蚕食钙化的基质。骨周围膜的毛细血管和血管周围的 MSCs 侵入基质。其中的一些 MSCs 分化为成骨细胞而以骨基质取代软骨基质，其他的形成骨髓的内膜和基质，仍有一些以 MSCs 的形式存在于内膜和基质中。骨骺端最后进行软骨分化和骨化。在幼年动物，软骨生长板位于骨干后端和骨骺之间，继续生长直到被两端的骨所取代。

骨发育的分子学基础包括多重信号中心和多种组织间的相互作用。肢芽形态发育与很多分子有联系，成纤维细胞生长因子(FGF)家族成员，比如 FGF-2、FGF-4、FGF-8 可以替代 AER 的功能，从而维持肢体向远端生长。组织间和基因间这类复合交互作用构建了肢体骨骼发育的框架。在骨形成的初始阶段，成骨部位的间充质细胞首先发生浓集。间充质细胞浓集后，结构性蛋白如 syndecan-3、tenascin versican 产生，随后，浓集中央区细胞显示软骨表型，此过程以 Col2 基因持续表达为标志，同时，核结合因子 1(Cb1)和 indian hedgehog(Ihh)基因也发挥诱导作用，但 Cb1 和 Ihh 的早期功能仍不明确。突变掉 Cb1 和 Ihh 基因的小鼠间充质细胞，虽然体积较小，仍可正常浓集，表明相关蛋白在细胞浓集或初始软骨细胞系定向分化中并非必要；然而，cbfd 和 Ihh 基因缺失的个体表型除明显的骨化障碍外，软骨成熟也受到干扰。

二、骨的形成

骨是高度动态的组织，主要功能包括支持和保护软组织，是肌肉力量的支点及支持血细胞的再生。一个最主要的功能是储存和释放钙来维持正常的血钙水平。这些功能需要骨骼不断降解和再生。在成年脊椎动物中，每年更新 10%的骨骼，相当于每 10 年全身的骨骼都被更换一次。在任何时候，这一过程都在全身多个部位发生。在这些部位，骨被多核的破骨细胞移除，同时被成骨细胞和骨基质形成细胞再生。这种持续的再生被称作骨塑性。如之前提到的，骨再吸收和再生由全身和局部作用引起。

(一)膜内成骨是直接原始的结缔组织膜内形成骨组织，主要见于颅骨的一些扁骨和面骨等。在将要形成骨的部位，间充质形成富含血管的胚性结缔组织膜，间充质细胞增殖并分化为成骨细胞，然后成骨细胞分泌形成类骨质，类骨质进一步钙化形成骨质。结缔组织膜内开始成骨的部位称为骨化中心。当骨化中心继续扩展时，周围的间充质细胞又逐渐分化成为成骨细胞，贴附在已形成的骨组织表面，形成新的骨组织，使骨组织体积逐步增大。新形成的骨组织还未完全成熟，是一种原始的骨组织，

以后由于破骨细胞的活动,将最初形成的原始骨组织吸收和改建成为具有骨板的密质骨和松质骨。内外表面为密质骨,两板之间的松质骨为板障,周围局部的间充质将发育成为骨膜。扁骨的外形和曲度也可随着成骨和破骨活动而有所改变,通过成骨、破骨和改建等一系列过程以适应组织发育。

(二)软骨内成骨的发育程序是先由间充质形成透明软骨,伴随人体发育,透明软骨逐渐退化,血管伴骨原细胞、成骨细胞和破骨细胞自软骨膜伸入,在退化软骨组织中造骨,进而最后取代软骨组织。人体大多数骨骼,如各种长骨和大部分不规则骨均属软骨内成骨。现以长骨为例,说明软骨内成骨的过程(图3)。

1. 软骨雏形形成:将要形成长骨的部位,由间充质分化形成透明软骨,其形成与将来形成的长骨相似,故称软骨雏形。软骨外面覆有软骨膜;在软骨雏形形成后,可通过附加性生长和间质性生长两种生长方式,使软骨雏形继续长大。

2. 骨领形成从胚胎第三个月开始,软骨中部的软骨膜以膜内成骨方式形成骨组织。这部分骨质围绕着软骨,形似领圈,所以称之为骨领。最初骨领薄而短,以后继续以膜内成骨方式成骨,使骨领逐渐增厚加长。骨领形成后其周围的软骨膜改称为骨外膜。

3. 初级骨化中心形成:在骨领出现的同时,软骨中部的软骨细胞成熟、肥大,软骨基质减少并有钙盐沉积,形成钙化的软骨基质,此时软骨细胞由于缺乏营养发生解体,在软骨中部出现大小不一的腔隙。软骨雏形内首先出现的这一钙化区,称为初级骨化中心。

4. 血管侵入骨外膜的血管伴随成骨细胞、破骨细胞及未分化的间充质细胞穿过骨领,进入初级骨化中心。其中的破骨细胞进行破骨活动,溶解钙化的软骨基质,形成许多腔隙,形成原始骨髓腔。成骨细胞则在残留的钙化软骨基质表面造骨,先后形成类骨质和骨质,构成原始的骨小梁。

5. 骨髓腔形成在初级骨化中心,由于破骨细胞和成骨细胞的破骨活动和成骨活动,原始骨髓腔逐渐融合扩大形成骨髓腔,腔内含有血管和造血组织。

6. 初级骨化中心向骨节后两端扩展延伸:骨干两端的软骨继续生长,骨髓腔进一步扩大,初级骨化中心向骨前两端方向扩延,直至在两侧骨前端形成次级骨化中心。这是一个动态发展的过程,在初级骨化中心还未推移到骨骼两端时存在着一个中间移行阶段—生长板,它显示了从骨骺端到骨干部软骨细胞分化不同阶段的特征(图3)。这时的长骨由软骨两端至骨髓腔根据软骨内成骨的顺序,分为以下各区:①软骨静止区:在长骨两端,软骨细胞数量多,体积小,分化能力强。此区是典型的透明软骨区,还未受到骨化的影响,软骨内成骨初期此区范围较大。②软骨增殖区:位于软骨静止区的骨干侧。此区内的软骨细胞分裂活跃,软骨细胞数量增多,沿着骨的长轴排列,这是软骨的生长区。由于软骨细胞的繁殖和基质增加,长骨逐渐加长。③软骨钙化区:位于细胞增殖区近骨干侧。软骨细胞不再进行分裂,软骨细胞由成熟到退化,胞体显著肥大,胞质内空泡明显增多,基质中有钙盐沉积。此区变化与

初级骨化中心相类似。④成骨区:此区近骨髓腔。可见软骨基质为血管所侵蚀,出现纵行隧道,这是破骨细胞破坏钙化的软骨基质所造成的。成骨细胞沿着残留的钙化软骨基质表面形成骨小梁,骨小梁不断生成又不断被破坏和改建,从而使骨干长度不断增加,骨髓向两端扩展延伸。

7. 次级骨化中心形成: 婴儿出生前后,在大部分长骨两端出现了新的骨化中心进行造骨,这就是次级骨化中心。其变化过程基本上和初级骨化中心相似,次级骨化中心要向四周扩展直至软骨被骨所代替。但骨端表面的一层软骨不发生骨化,最终成为关节软骨。在骨前和骨干交界处也保留着一片软骨称骺板。在骨生长尚未停止前,前板的骺软骨继续保持着增生能力,借此可增加骨的长度。直至青春期末或 20 岁左右,骺板软骨细胞才失去增生能力,发生骨化,骺板完全为骨组织所替代,称为骨骺闭合。但在骨骺与骨干连接处,仍可见一条致密线,称骺线,为骨化的骺板遗迹。

8. 哈弗斯系统形成 哈弗斯系统(Haversian system)又称骨单位(osteon),约在出生一年后开始形成。破骨细胞侵入原有骨组织,形成一些纵行的沟或隧道。

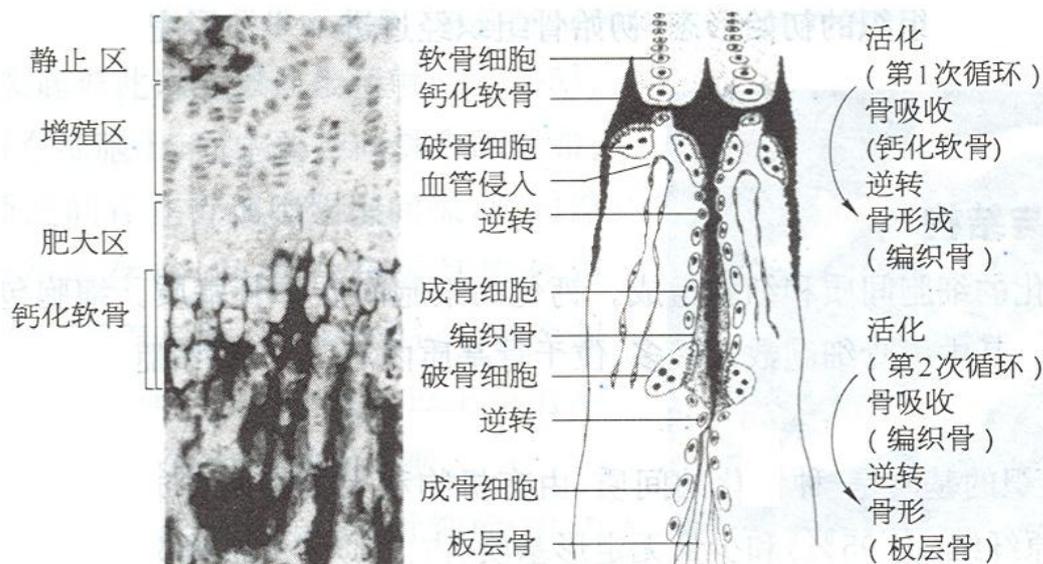


图 3. 生长板处骨的形成和塑形过程。左图示光镜下软骨细胞分化区和矿化区(黑色)。右图示长骨生长板处细胞发育。钙化软骨基质经多次重复“活化-吸收-形成”骨塑形循环过程形成。来自骨干表面或骨髓腔面的血管穿行其中,伴随血管进入的成骨细胞衬附于沟或隧道的内壁,由外向内逐层地形成同心圆排列的骨板,中央的纵行管道即为哈弗斯管,两者共同构成哈弗斯系统。在骨领的外面和内面分化成为外环骨板和内环骨板。在人的一生中,哈弗斯系统不断进行更新,新的哈弗斯系统替代旧的哈弗斯系统,旧的哈弗斯系统被破坏后,所残存的不完整骨板即为间骨板。如此代代更新,往复循环。

多条信号调节通路可以影响骨发育。目前认为甲状旁腺激素相关肽(PTHrP)和 Ihh 在调节软骨

细胞生长和成熟过程中发挥重要作用。而转录因子 *Cbfa-1* 是成骨细胞分化和骨基质形成所必需的。某些基因如 *csf-1*、*c-fos* 和 *c-src* 的突变会影响破骨细胞的发育和功能, 导致骨重塑缺陷和继发骨硬化发生。同样, 骨保护素 (osteoprotegerin) 的突变可导致骨质的疏松。

(三) 骨发育过程中血管化的作用: 血管化在膜内和软骨内成骨的过程中均起重要作用。膜内成骨过程中, 间充质细胞聚集, 同时, 上皮细胞侵入建立血供。而软骨内骨化中, 软骨细胞增殖、分化并凋亡, 血供进入, 细胞外基质形成并重塑。软骨内成骨的过程是一个无血管组织 (软骨) 转变到高度血管化组织 (骨) 的过程。软骨被骨替代的关键在于组织血管化。骨发育过程中一些关键性调节因子, 包括血管内皮生长因子家族以及它们的受体如 *Flt*、*Flk* 和 *neuropilin* 基因家族成员可能参与了血管化调节, 这一领域还有待于进一步研究。

(四) 骨形成和间充质环境: 力学因素可影响骨的形状和长度。间充质细胞可以分化成骨气软骨和纤维组织, 取决于局部力学信号。体内和体外研究证实力学因素影响软骨形成和软骨内骨化的早期阶段。变形牵张容易导致纤维组织或骨组织形成, 而静力压缩则诱导纤维软骨或软骨的形成。但是, 目前对于力学刺激对骨形成的细胞和分子生物学作用机制还知之甚少。

第二节 生物学因素

骨是一种有生命的组织器官, 其发生涉及到体内外多种因素的共同调控。骨组织受到各种内源性或 (和) 外源性因素的干扰后, 其组织结构会发生不同程度的改变, 从而导致其功能也受到不同程度的影响。有些因素是增强骨的功能, 如适当应力刺激下的骨质增强; 有些因素影响骨的功能, 如骨折、绝经后骨质疏松等。总体而言, 骨再生的调控因素包括生物学和生物力学两大因素。

骨的再生能力主要依赖于成骨细胞的诱导作用及其向新骨形成区的迁移能力。诱导的具体过程尚不完全清楚, 目前认为是通过细胞-基质-骨诱导因子-细胞的相互影响起作用。成骨细胞本身能够合成并分泌多种骨诱导因子, 其中大多数因子在骨形成过程中分布于细胞外基质。这些骨诱导因子调节骨原细胞、成骨细胞及破骨细胞的增殖、分化及代谢等功能, 通过自分泌及旁分泌机制来启动和调控骨再生过程。

骨代谢与损伤时的再生过程与胚胎时期骨发育过程极为相似, 是一个非常复杂的过程。骨再生需要三个必要条件: 刺激因子、靶细胞和特定的环境, 即一组未分化的前体细胞移行到损伤部位, 然后在一定骨诱导因子刺激下开始发生形态变化, 定向分化为成骨细胞, 成骨细胞再合成胶原, 同时细胞外基质钙化, 完成骨再生过程。这一过程受多种因素影响, 其中骨诱导因子的局部调节发挥着重要的作用。这些骨诱导因子通过自分泌和旁分泌过程促进成骨细胞增殖和骨基质的合成, 调节骨再生, 而且,

这些骨诱导因子相互作用,形成复杂的网络系统,影响、控制骨再生过程。目前,促进骨再生的骨诱导因子包括 BMP、TGF- β 、IGF、PDGF、FGF 以及 VEGF 等。这些骨诱导因子,在骨再生过程中发挥着重要的作用,它们促进间充质细胞的增殖并使其向成骨细胞发生分化,并且还促进成骨细胞的增殖、黏附、合成分泌骨基质以及骨再生过程中血管的增生等作用。

(一)骨形态发生蛋白 BMP 属于 TGF- β 细胞因子超家族,是一类从骨基质中分离提纯并能高效诱导骨、软骨和组织发生的疏水性酸性糖蛋白,是一种多功能的细胞生长因子。1889 年 Senn 在用脱钙的公牛骨残渣和三碘甲烷治疗骨髓炎骨缺损时注意到脱钙的公牛骨可以促进骨缺损的愈合。1965 年,Urist 等发现一种骨组织诱导能力的活性蛋白,他把这种活性蛋白命名为“骨形态发生蛋白”或“成骨蛋白”。随着分子生物学和基因工程的发展,1988 年 Wozney 等利用重组 DNA 技术首先克隆得到 hBMP-1、BMP-2A(即 BMP-2)、BMP-2B(即 BMP-4)和 BMP-3 的 cDNA,并在真核细胞和原核细胞中获得表达。1990 年 Celeste 等报道了另外三种 BMP,并建议将已克隆的 BMP 分别命名为 BMP1~7。迄今,已发展到 BMP15。其中,BMP-2、BMP4-8、BMP14 具有成骨诱导作用,以 BMP2 和 BMP-7 促进骨再生的作用最强。2002 年,美国 FDA 批准了 BMP7 应用于临床。BMP 作为细胞外信号可结合并激活靶细胞膜上的特异性受体,通过 Smad 依赖性和 Smad 非依赖性两种信号途径发挥生理作用,其中对 Smads 依赖性信号传递途径研究较多。BMP 信号传导属于激酶传导系统。在体内 BMP 以自分泌或旁分泌的形式释放后,两个 BMP 单体通过二硫键连接形成二聚体,BMP 二聚体结合位于靶细胞膜上两型不同的丝氨酸/苏氨酸激酶受体,即 BMP I 型和 II 型受体,使 BMP I 型和 II 型受体发生磷酸化而被激活。BMP 受体激活后,活化的 BMP I 型受体作用于胞质内的 Smad 蛋白。BMP I 型受体能磷酸化 BR-Smad 羧基末端的丝氨酸,激活的 BR-Smad 与 Co-Smad 结合形成转录复合物,复合物转入核内与各类共激活和/或抑制因子结合调控下游 BMP 相关的基因转录。由于 BMP 在生物体内的广泛作用,细胞需要对 BMP/Smad 信号通路的强度和持续时间进行严密精确的调控,在信号通路的各水平包括细胞外、胞质内及核内均存在复杂的调节模式。

(二)血管内皮细胞生长因子 VEGF 能特异性地作用于内皮细胞,促进其增殖和血管生成,参与骨的再生与修复过程。血管内皮生长因子又称血管渗透因子(VPF),是由 Ferrara 等于 1989 年首先发现,是特异性促血管内皮细胞有丝分裂原,在体内外均可特异性的促进血管内皮细胞生长,进而诱导血管生成。VEGF 还具有增加血管通透性和抑制内皮细胞凋亡的作用。VEGF 是由二硫键交联形成的同型二聚体糖蛋白,分子质量为 34~45kDa 序列高度保守,对热和酸稳定,与肝素有很高的亲和力。VEGF 因其 mRNA 的剪接方式不同可分为 5 种异构体,即 VEGF-121、VEGF145、VEGF165、VEGF189 和 VEGF-206。

在表达 VEGF 的细胞类型中,大多数细胞能同时表达多种 VEGF 的异构体,通常 VEGF-121 和 VEGF165 的表达占主要地位。 VEGF 存在于生长板的低增长区,可能在这个部位发挥着刺激内皮细胞向软骨内生长并启动软骨钙化成骨的作用。在牵引成骨过程中 VEGF 在牵引的中心区也存在表达。研究表明,绝大多数成骨诱导因子具有刺激 VEGF 合成的作用。VEGF 只是诸多骨诱导因子网络中的一员,其表达可被 BMP、TGF- β 、IGF-I 和 bFGF 等因子调节,而 VEGF 又可以反过来促进新骨形成。VEGF 可能作为一个关键因子介导其他因子并与其他因子互相作用,共同促进血管形成及骨再生。 VEGF 的生物学活性主要是通过两个酪氨酸受体介导的,它们是 180kDa 的 VEGFR-1 和 VEGFR-2。其中, VEGF 的主要生物学功能都是通过 VEGFR-2 实现的, VEGFR-2 和 VEGF 结合后发生二聚体化,并且胞内的酪氨酸残基自身磷酸化。激活的 VEGFR-2 进一步引起下游一系列与细胞增殖、迁移、逃避和凋亡相关的蛋白质磷酸化。原代内皮细胞在受到 VEGF 的刺激后,许多信号转导分子被激活或修饰。它们包括 PI3K、PLC γ 、Src 家族酪氨酸激酶、RasGAP、Nck、FAK、Akt/PKB、PKC、Raf-1、MEK、ERK 和 p38MAPK。实验发现, VEGFR-2 转染细胞受到 VEGF 刺激后,还有包括 Grb2、Shc、STAT 和 SHP1/2 在内的信号分子被磷酸化。低分子量蛋白酪氨酸磷酸酯酶(HCPTPA)也直接参与这个过程,调节 VEGFR-2 自身磷酸化及 ERK 的激活(图 4)。VEGF 通过作用于成骨细胞强表达的 VEGFR-1 而使成骨细胞发生趋化、增殖作用,对骨再生起到正向调节作用。而通过作用于 VEGFR-2 促进内皮细胞成熟和血管生成,参与骨的再生过程。

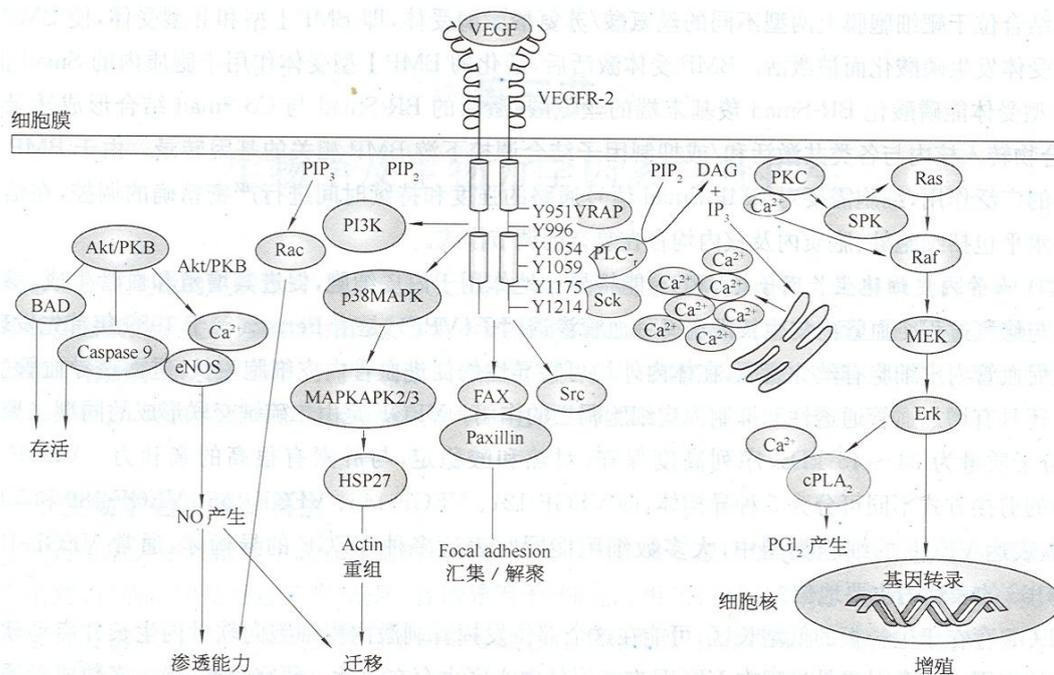


图 20-10 VEGFR-2 细胞内信号转导通路示意图

图 4. VEGFR-2 细胞内信号传导通路示意图。

(三) 转化生长因子 TGF- β 是近年来发现的一种蛋白多肽分子, 广泛存在于动物正常组织细胞以及转化细胞中, 在骨和血小板的含量最丰富, 骨含量高达 200ng/(克骨)。TGF- β 是由 2 个分子质量为 12.5kDa 的亚基通过二硫键连接而成的具有生物活性的同源二聚体。其超家族根据其序列同源性和所激活的信号通路的不同分为两个亚家族: TGF- β /Activin/Nodal 亚家族和 BMP/GDF/MIS 亚家族。哺乳动物主要有 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3 种形式。TGF- β 是细胞生长的双功能调节因子, 它对成骨细胞的生长是促进作用还是抑制作用, 主要取决于骨细胞的来源、所用剂量及试验条件等。Wrana JL 等从胎鼠颅骨中分离出含有丰富成骨细胞和成纤维细胞的细胞群落, 加入 TGF- β 后发现, 它能刺激 I 型胶原、黏连蛋白及黏附分子等细胞外基质蛋白的生物合成和骨基质的沉积和趋化。同时也发现, TGF- β 使成骨细胞失去多边形形态, 其碱性磷酸酶的活性降低, 提示 TGF- β 对成骨细胞有一定的抑制性。Oreffo RO 等发现 TGF- β 也可抑制破骨样细胞的形成, 他们认为 TGF- β 是骨改建过程中一种内源性抑制因子, 它使得破骨细胞的骨吸收活动中止, 从而使骨改建进入新骨形成阶段。Tatakis DN 等用碳酸钙作载体, 将重组人 TGF- β 1 植入狗的牙周缺损处, 观察其牙骨质和牙槽骨再生情况, 发现其临床效果十分有限。因此, TGF- β 在骨再生过程中的双向作用尚需进一步的研究。TGF- β 信号分子通过跨膜的受体复合物进行信号转导, 这些受体根据分子质量大小可分为三型。I 型 (50-60 kDa) 也称 ALKs (activin receptor like), II 型 (75-80kDa) 和 III 型 (280kDa)。I 型、II 型受体属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族, II 型受体能以较高的亲和力与 TGF- β 配体结合, 并与 I 型受体形成异源受体复合物, 将 I 型受体近膜的一段富含甘氨酸、丝氨酸残基的区域 (GS 结构域) 磷酸化, 从而启动胞内信号级联反应。Smad 是细胞内重要的 TGF- β 信号转导和调节分子, 可以将 TGF- β 信号直接由细胞膜转导入细胞核内。R-Smad 的 S-S-X-S 区被 I 型受体磷酸化后, 就与 I 型受体分离, 并和 Smad4 形成异聚体转录复合物, 移入核内与许多辅助活化因子 (co-activator) 和辅助抑制因子 (co-inhibitor) 协同作用, 调节靶基因的转录 (图 5)。此外, TGF- β 还可激活不依赖 Smads 的其他信号通路, 如促分裂素活化蛋白激酶 (MAPK) 通路。TGF- β 和 BMP-4 都能够激活 MAPKKKs 家族成员的 TGF- β 激活激酶从而激活 JNK 和 P38MAPK 信号通路。TGF- β 诱导的 Erk 和 JNK 通路的激活可导致 Smad 磷酸化激活, 而 TGF- β 诱导的 Ras/ErkMAPK 信号的激活也可诱导 TGF- β 的表达。TGF- β 诱导的 MAPK 途径的激活也可通过与 Smad 相关转录因子的直接作用影响转录应答。另外, TGF- β 可激活 Rho-GTP 酶 (一种与细胞骨架调节密切相关的酶), 包括 RhoA、Rac 和 Cdc42, 以调节细胞骨架结构。

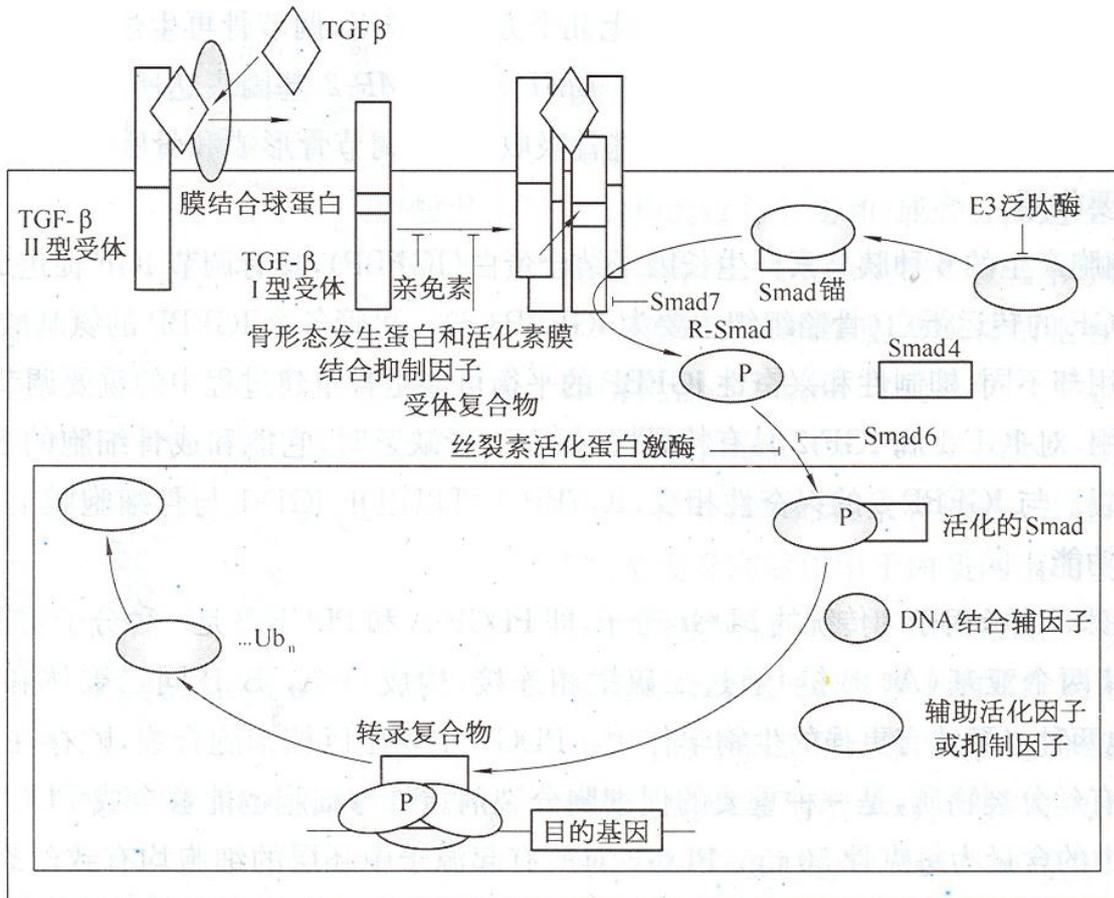


图 5. TGF- β /Smad 信号转导途径的示意图。

(四) 胰岛素样生长因子 (IGF). IGF 是一类类似胰岛素原并具有胰岛素样生物活性的多肽, 主要包括 IGF-1 和 IGF2 两类, 它们分别是拥有 70 和 67 个氨基酸残基的单链多肽, 由 3 个双硫键交叉连接而成, 分为 A、B、C 和 D 四个区, 其中 B 功能区 N 端前 16 个氨基酸是载体蛋白结合的关键部位。IGF-1 和 IGF-2 在骨组织含量丰富, 尤其是 IGF-2 是骨基质中含量最丰富的生长因子 (1500ng/g)。IGF2 与 IGF-1 在体外试验中有类似的效应, 但是 IGF-2 刺激骨再生的潜力不如 IGF-1。IGF-1 也叫促生长因子, 主要由肝脏合成, 可作用于骨组织细胞表面的受体。IGF-1 的分泌方式有自分泌、旁分泌和内分泌三种。IGF-1 在骨基质中的含量为 100ng/g 饵, IGF-1 与胰岛素原有 60% 的结构同源性。IGF-1 对糖、蛋白和骨代谢均有重要影响, 其作用与胰岛素相似。IGF-1 受体有两种类型, 即 I 型和 E 型受体, 各种组织细胞均有表达。IGF-1 受体与胰岛素受体结构很相似, 由两个分子量为 135kDa 的 α 亚基和两个 90kDa 的 β 亚基组成, 通过二硫键连接成四聚体。 α 亚基有与 IGF-1 结合的位点位于细胞外泊亚基包含跨膜区、ATP 结合位点及酪氨酸激酶区。但两种受体各有自己的特点, 且其作用机制不同, IGF-1 的作用是由 I 型受体介导的, 通过结合于细胞膜受体而发挥作用。当配体结合到受体后引起受体自身磷酸化和细胞内基质的酶氨酸磷酸化, 继而产生一系列磷酸化连锁反应及相应的生物效应。IGF-1 和

IGF2 发挥作用大部分是由 IGF-1 受体介导的。IGF-1 对动物成骨细胞功能的影响主要包括以下几个方面:①促进骨祖细胞的增殖。②促进成骨样细胞的增殖和分化。③促进骨吸收和骨形成的偶联、加速骨转换作用。④阻止胶原酶的转录和促进胶原的合成。⑤刺激细胞内维生素 C 循环和抗坏血酸盐的积聚。IGF-1 对人类成骨细胞的作用主要表现在以下几方面:①促进成骨样细胞和骨髓基质细胞的增殖和分化。②促进骨吸收和骨形成的偶联,加速骨转换。③提高成骨细胞的存活能力。IGF-1 通过以上几个方面的作用,调节骨再生过程。有研究表明,IGF-1 促进成骨细胞增殖、分化可能是通过增加细胞中 BMF-7 及 BMP-2 基因表达所介导的。IGF 既可作用于成骨细胞促进骨形成,又可作用于破骨细胞促进骨吸收,从而调节骨形成和骨吸收之间的平衡,在骨重建过程中发挥重要作用。另外,由骨细胞产生的 6 秒胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP,具有调节 IGF 促进成骨细胞增殖和分化的作用,是 IGF 的转运蛋白(骨骼组织主要为 IGFBP3-5)。尽管各个 IGFBP 的氨基酸顺序相似,但它们对骨细胞的作用却不同,抑制性和兴奋性 IGFBP 的平衡可能是骨重建过程中的重要调节机制。IGFBP5 增强 IGF 的作用,对 IGF-1 和 IGF-2 具有特异性,但在二者缺乏时,它能和成骨细胞的表面受体直接结合以刺激有丝分裂。与 IGFBP-5 的兴奋性相反,IGFBP-4 可以阻止 IGF-1 与骨细胞膜上的受体结合,从而抑制 IGF-1 的功能。

(五) 血小板源性生长因子 PDGF, 传统的 PDGF 分子,即 PDGF-A 和 PDGF-B 是一种分子质量为 28-35kDa 的双链蛋白质,其两个亚基(A、B 链)通过二硫键相连接,构成 A-A,B-B 同二聚体和 A-B 异二聚体。PDGF-BB 较其他两种二聚体有更强的生物学作用。PDGF 主要由巨核细胞合成,贮存在血小板中,是血小板分泌的主要有丝分裂物质,是一种重要的促细胞分裂剂。骨母细胞也能够合成 PDGF,有资料表明,PDGF 在骨基质中的含量为每克骨 50ng。PDGF 对所有起源于中胚层的细胞均有致丝裂原活性,PDGF 能诱导细胞合成 DNA,激活酪氨酸激酶,增加释放花生四烯酸和 PGI₂、PGE₂活化腺苷酸环化酶,活化丝氨酸/苏氨酸激酶,诱导基因转录和细胞表面特性改变。Hughes FJ 等发现,在胎鼠颅骨组织培养基中,PDGF 对于碱性磷酸酶阳性和阴性的细胞均表现出强大的趋化作用,并能刺激胶原和非胶原蛋白的合成,从而促进软骨和骨的再生。PDGF 还能促进血管内皮细胞的增殖,诱导 VEGF mRNA 的表达,从而促进骨折部位血液循环的重建。此外,破骨细胞表面也存在 PDGF 受体,PDGF 与其结合后激活破骨细胞,增强其骨吸收的功能。PDGF 还具有促进前列腺素合成的功能,从而导致骨吸收。因此,PDGF 在骨再生后的改建塑形中也具有重要的作用。PDGF 的生物学作用机制目前尚不完全明确。Chaudhary 等发现,PDGF-BB 通过激活特异性磷脂酰肌醇 3-激酶(PI 3K,进而激活 ERK1 和 ERK2 途径以及 Akt 途径,从而调节成骨细胞存活。而且通过激活 ERK 信号途径促使成骨细胞 I 型胶原基因表达下调。PDGF 对破骨细胞的作用可能是通过影响 IL-6 的表达实现的。IL-6 是一种诱导破骨细胞活动的主要细胞

因子。PDGF 与破骨细胞表面 PDGF- β 受体相互作用, 激活转录因子, 导致 IL-6 表达, 从而诱导破骨细胞活动。此外, PDGF 引起的细胞迁移需要酪氨酸激酶的激活和 EDG-1 的表达。近年来, 又发现了 PDGF-C 和 PDGF-D 两个新成员, 它们构成 C-C、D-D 两个同二聚体, 其在骨再生修复过程中的作用研究较少, 尚需对这两个新成员作进一步的研究。PDGF 的受体有 PDGFR- α 和 PDGFR- β , PDGF 的 5 种异构体与 PDGF 受体的作用见图 6。

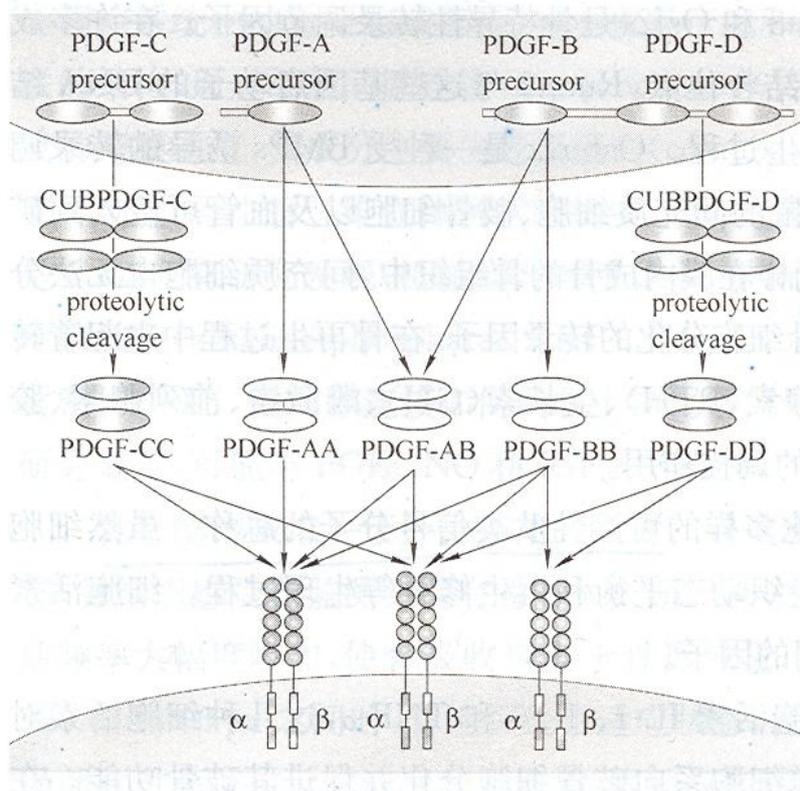


图 6. PDGF 的 5 种异构体与 PDGF 受体的作用的示意图。

(六) 成纤维细胞生长因子(FGF). FGF 是一种对中胚层和神经外胚层细胞具有促有丝分裂作用的多肽生长因子, 广泛存在于脑、垂体、肝、肾、骨、软骨、角质细胞、血管平滑肌细胞、成肌细胞、星形细胞等组织细胞中。FGF 对细胞存活、增生、分化、黏附、迁移、血管生成及胚胎发育等发挥重要的调节作用, 对胚胎发育及骨软骨的修复起重要作用。成骨细胞也分泌 FGF 并沉积在骨基质中, 可刺激成骨细胞增殖和毛细血管生成, 促进骨再生。现已发现 FGF 的 18 个成员, 即 FGF-1-18。目前研究得最多的是 FGF-1 和 FGF-2, 根据它们等电点(PI)的不同, FGF-1 又称为酸性成纤维细胞生长因子(aFGF, PI 为 5.6), FGF-2 又称为碱性成纤维细胞生长因子(bFGF, PI 为 9.6), 它们均通过自分泌和/或旁分泌途径在组织修复中发挥重要作用, 二者的生物效应基本相同。 FGF 对骨祖细胞及成骨细胞有促增殖作用, 其作用机制为 FGFs 与受体结合后激活蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC), PKC 可促进

原癌基因 *c-fos* 和 *c-jun* 的转录和表达,引起细胞增殖。同时 IP_3 浓度升高后作用于内质网上的受体,释放 Ca^{2+} , Ca^{2+} 浓度升高可促进 PKC 活化。此外活化的 PKC 可直接磷酸化细胞核膜上的核纤层蛋白 B,导致有丝分裂过程中核纤层的解离,促进分裂。但是,FGF 在刺激骨组织细胞增殖的同时,对成骨细胞的分化作用,存在不同的观点。Ernesto 等在体外实验中发现 FGF-2 可以抑制 I 型胶原蛋白的合成和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的活性。Rodan 等在具有成骨细胞特性的骨肉瘤 ROS17/2.8 细胞系中加入 FGF-2,反映成骨细胞分化特性的 ALP、骨钙素及 I 型胶原的 mRNA 表达均减少。Rodan 考虑 FGF 可能是通过激活 Gi 蛋白,降低胞液中的 cAMP 的水平而发挥抑制细胞分化的作用。Hurley 等认为 FGF-2 激活 PKC 而活化 *c-fos* 和 *c-jun* 基因,其表达产物与 I 型胶原基因启动子上的 AP-1 位点结合,抑制其转录,减少 I 型胶原的合成。而对于 FGF-2 促进成骨细胞分化的观点,Nakamura 等认为 FGF-2 在体内促进成骨细胞分化是由于激活内源性 TGF- β 表达的结果。FGF 不仅在骨损伤初期促进新生骨痂形成,还在骨痂改造塑型期介导骨吸收,在骨改建过程中发挥重要作用。FGF 促进成骨细胞合成胶原酶-3,胶原酶-3 将骨基质中的胶原纤维裂解成若干小片段再由其他蛋白酶如明胶酶(gelatinase)进一步降解,释放 Ca^{2+} ,促进骨吸收。其机制为 FGF 与受体结合后激活 *c-fos*、*c-jun* 基因,其产物通过亮氨酸拉链结构形成 jun-fos 异二聚体,异二聚体可与胶原酶-3 基因启动子上的 AP-1 位点结合促进其转录。在缺乏 FGF 时,胶原酶-3 基因的 AP1 位点与 jun 结合处于静息状态,表明 FGF 促进 *c-fos* 增加可刺激胶原酶-3 基因的表达。另外,FGF 另一种重要功能是促进新生血管形成。

(七)成骨细胞刺激因子 1(Pleiotrophin, PTN). PTN 又称肝磷脂结合相关生长因子(Heparin-binding growth-associated molecule, HB-GAM),是一种含 136 个氨基酸残基的多肽,在胚胎组织中广泛表达,但成年期只在骨及大脑中表达。1990 年,Tezuka 等应用成骨细胞和成纤维细胞之间不同的杂交筛选技术,在颅顶骨富含的成骨细胞及 MC3T3-E1 细胞中检测到 PTN 的 mRNA,并命名为成骨细胞刺激因子 1。有研究表明,在细胞培养中,它刺激成骨细胞及软骨细胞的分化。另外,有人认为 PTN 在软骨内化骨的血管化过程中起着一定的作用。Yang 等的研究显示,PTN 能够促进人骨原细胞,尤其是后期的骨原细胞的迁移、黏附、增殖及分化。虽然,TareRS 等报道 PTN 没有像 BMPs 那样的骨诱导潜力,但是 PTN 在骨再生及调节 BMPs 的骨诱导性中起着重要作用。

(八)其他骨诱导因子除了以上研究较多的骨诱导因子外,还有其他许多生长及转移因子在生中起着重要作用。Runx2(也称 Cbf α 1、PEBP2Aa、AML-3 和 Osf2 是骨特异性转录调节因子。在许多成骨细胞特异性基因的启动子区域都存在 Runx2 的 DNA 结合位点,Runx2 与这些基因启动子的 DNA-结合位点结合,激活或抑制这些基因的转录过程,调节骨再生过程。Osterix 是一种受 BMPs 诱导的转录调节因

子,特异性地在骨组织中表达。Osterix 基因敲除小鼠的间充质细胞、破骨细胞以及血管可侵入到矿化的软骨基质中,但这些间充质细胞无法产生骨基质。同样在膜内成骨的骨组织中,间充质细胞也无法分化为成骨细胞。这些发现表明 Osterix 是特异性调节成骨细胞分化的转录因子,在骨再生过程中也起着转录水平的调节作用。此外,还有一氧化氮(NO)、甲状旁腺素(PTH)、生长素(GH)、雌激素、前列腺素、胶原片段以及其他细胞因子在骨再生的过程中发挥着不同的调控作用。

(九)细胞活素,又称细胞因子或细胞素,是一组变化多样的可溶性肽类信号分子的总称。虽然细胞活素广为人知的是在炎症方面的作用,但是它们也影响组织动态平衡和再生修复等生理过程。细胞活素由多种细胞产生,是一种典型以旁分泌和自分泌方式作用的因子。与骨再生调节过程有关的细胞活素主要是促炎症细胞活素 IL-1、IL-6 和 TNF- α , 这几种细胞活素对骨吸收有重要的调节作用。它们刺激未分化的颗粒/巨噬细胞系向破骨细胞分化并促进其破骨功能。在许多炎症情况下,如感染、骨自溶症、骨质疏松和关节炎等疾病中,这些细胞活素都参与了骨的再吸收过程。动物实验证明,雌激素水平低下引起的骨吸收与骨髓间质细胞分泌的 IL-6 增多相关。新的研究发现,骨髓间充质干细胞(MSC),能够发育成硬骨、软骨、脂肪和其它类型的细胞。破骨细胞也合成 IL-1、IL-6 和 TNF α , 因此在某些破骨细胞数量增多的病理状态下,如骨巨细胞瘤,IL-1、IL-6 和 TNF α 合成也增多,进而刺激骨的吸收。此外,骨骼系统的细胞除了对微环境的细胞活素起反应外,其自身也分泌细胞活素。成骨细胞在 PTH 的作用下及前列腺素的刺激下可以合成和分泌 IL-6。由于 PTH 对破骨细胞没有直接的作用,因此推测 PTH 的促骨吸收作用很可能是由于 PTH 刺激成骨细胞合成分泌 IL-6 的缘故。研究表明 IL6 还可以刺激成骨细胞的分化与增殖,因此,IL-6 也被认为是一个骨形成的刺激物。

骨再生是一个复杂的过程,在此过程中不仅仅涉及骨原细胞及成骨细胞的增殖、分化等促进骨再生的过程,还包括破骨细胞对新形成骨组织的吸收改建,骨再生即在骨形成和骨吸收的动态平衡中完成的。同时,任何一个骨诱导因子都不是孤立地起作用,而是与其他因子一起相互影响、相互作用、相互协调,共同完成对骨再生过程的调控。

第三节 信号转导与再生

一、wnt 信号转导通路在修复与再生中的作用

目前的研究已经证实 Wnt 信号通路在皮肤、骨骼、肌肉、心脏等的损失修复与再生中起着重要作用。

(一) Wnt 信号转导通路在皮肤修复与再生中的作用哺乳动物皮肤对维持内环境稳定起着极其重要的生理功能。皮肤提供了水分屏障, 毛囊、汗腺和真皮毛细血管调节体温, 皮脂腺提供了润滑剂。哺乳动物全层皮肤损伤后的皮肤修复往往形成瘢痕组织: 富含胶原的真皮基质上覆盖着简单的复层上皮, 这与原始皮肤的外形和功能截然不同。富含胶原的基质在真皮沉积很容易挛缩, 丧失弹性和牵引力, 并形成肥厚性瘢痕。大面积元表皮附属器的皮肤导致秃顶、干燥和热失调。根本的问题是成体哺乳动物皮肤创伤后不能再生原始的皮肤组织结构。尽管在毛囊突有多能的表皮干细胞, 真皮有未分化的间充质细胞, 但在成体皮肤创伤愈合中并未观察到再生。皮肤中未分化细胞的存在表明皮肤有再生的潜能, 但是组织创伤的分子信号环境促进瘢痕修复, 而不是再生, 可能是缺乏促进再生的相应的分子信号。Wnt 信号是正常皮肤发育所必需的。β-连环蛋白依赖的信号参与毛囊的形态发生。转基因小鼠表皮表达稳定的 β-连环蛋白导致毛囊形态形成。当去除表皮 β-连环蛋白表达, 毛囊形态发生被阻断。β-连环蛋白决定皮肤干细胞命运起着重要作用, 没有 β-连环蛋白时分化为表皮的而不是毛囊角质细胞。依赖细胞环境 Wnts 激活 β-连环蛋白依赖的信号途径。Wnt4 表达在成体和胚胎小鼠的皮肤, Wnt5a 和 Wnt11 表达在胚胎小鼠的真皮。成体哺乳动物皮肤要出现再生, 重定位于创面的细胞必须对引导皮肤发育的同一形态发生素反应, 而且形态发生信号的成分必须出现在合适的环境。通过 β-连环蛋白非依赖途径激活的 Wnt 配体, 包括 Wnt4、Wnt5a 和 Wnt11, 在创面短暂上调; 而 β-连环蛋白依赖的 Wnt 信号在创缘附近的上皮毛囊激活, 而不是在创面或被覆上皮。在创面, 用氯化锂异位激活 β-连环蛋白依赖的 Wnt 信号导致真皮内的上皮囊肿、表皮内偶然出现的初级毛囊结构。相反, 在深部伤口, 强制表达 Wnt5a, 可诱导毛囊间上皮类似于再生的改变, 包括在创面真皮形成上皮覆盖的囊, 初级毛囊和皮脂腺, 并不形成肿瘤。在皮肤创伤修复过程中, 成体毛囊间上皮对 Wnt 信号做出反应, 以恢复上皮组织的模式。Colwell 等的研究也发现在胎儿和出生后的成纤维细胞, TGF-β 直接增加 Wnt4 的表达, 在胎儿和出生后的创伤修复过程 Wnt 表达增加。

(二) Wnt 信号转导通路在肌肉、骨骼修复与再生中的作用经典的 Wnt 信号在骨生理中起着重要作用, 并且在低等脊椎动物器官再生中发挥作用。Wnt 信号通路在鹿角, 这一仅有的具有再生能力的哺乳动物器官再生过程中起着重要作用。软骨内骨化位点的软骨细胞和成骨细胞 β-连环蛋白表达水平很低, 而膜内骨的细胞骨膜和成骨细胞表达 β-连环蛋白水平较高。β-连环蛋白表达最强区是在间充质生长区的未分化细胞, 在 Lef/TCF 水平抑制经典的 Wnt 通路, 从这一区来源的培养鹿角祖细胞数量减少。β-连环蛋白通过成骨细胞调节骨形成的功能可能是位点特异性的。骨折修复的早期阶段, 除了

LEF1 下调,所有的 Wnt 信号成员和靶基因都上调。在肌肉再生过程中,Wnt 信号机制诱导 CD45⁺成体干细胞向肌源性分化。

二、Notch 信号转导通路在修复与再生中的作用

目前的研究已经证实 Notch 信号通路在神经、耳、心脏、骨骼、肌肉等的损失修复与再生中起着重要作用。在骨骼肌再生过程中,Notch 信号参与体节的形成、肌肉发育,以及肌肉干细胞的增殖和命运决定。在每个过程中,Notch 信号的时空控制对正确的组织形成都是必需的。这种控制被一系列的,通过调节蛋白质加工、定位、活性、稳定性来增强或抑制 Notch 信号的调节蛋白和蛋白复合物介导。在老年人,骨髓肌的修复和再生能力下降,研究显示老年小鼠损伤的肌肉存在 Notch 信号缺陷,因为 Notch 配体 Delta-1 上调受损。Delta-1 促进卫星细胞增殖以修复损伤的肌肉;激活 Notch 信号足以逆转年龄相关的肌肉再生能力下降。

三、Hedgehog 信号转导通路在修复与再生中的作用

目前的研究已经证实 hedgehog 信号通路在眼、肢体、尾部、神经、血管等的损失修复与再生中起着重要作用。Hedgehog 蛋白对神经系统发育很重要。激活的 Hedgehog 信号通路下游诱导原始骨髓造血细胞循环和扩增。另有研究者证明 Hedgehog 通路在心血管系统修复和再生中起着重要作用。给予外源性 Shh 能够诱导血管生成,可加速缺血心肌和骨骼肌的修复。把 *Shh* 基因转移到急性和慢性心肌缺血的动物,结果显示 *Shh* 基因转移后,哺乳动物成纤维细胞和心肌细胞 Hedgehog 通路上调、新生血管形成增强、纤维化和心肌凋亡减少、左心室功能得以保存。

第四节 生物力学因素对骨再生的影响

生物力学因素(骨弯曲或压力)是最主要的骨源性刺激,并最终促进骨形成。现有数据表明,外力导致的骨变形引发骨细胞周围液体增多并从凹陷的骨表面转移到更突出的表面。这一过程引发骨源性反应,但这些力学信号如何改变为细胞信号始终未知。骨移除和替代速度的不平衡导致骨骼异常。当移除速度超过替代速度,导致低骨密度,即骨质疏松。反之则导致高骨密度,即骨骼石化症。有很多和遗传有关系的异常与骨的重塑系统相关。

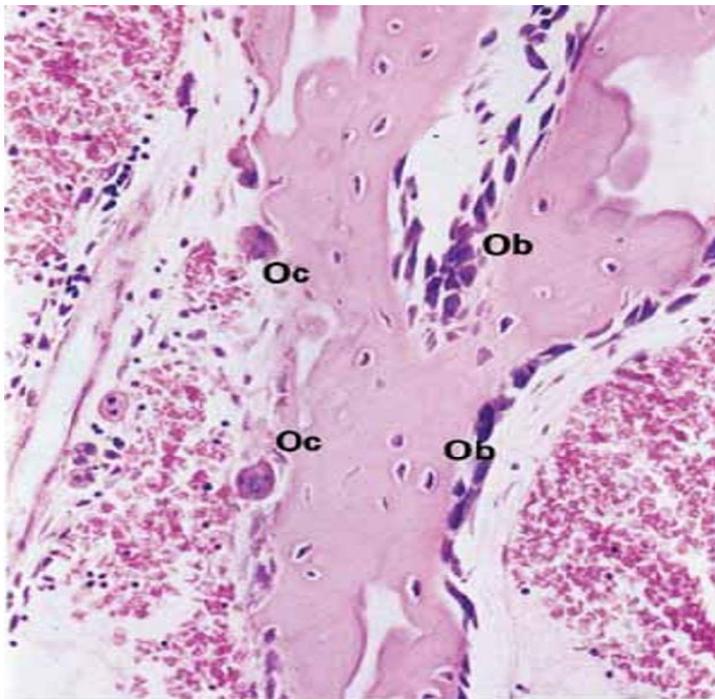
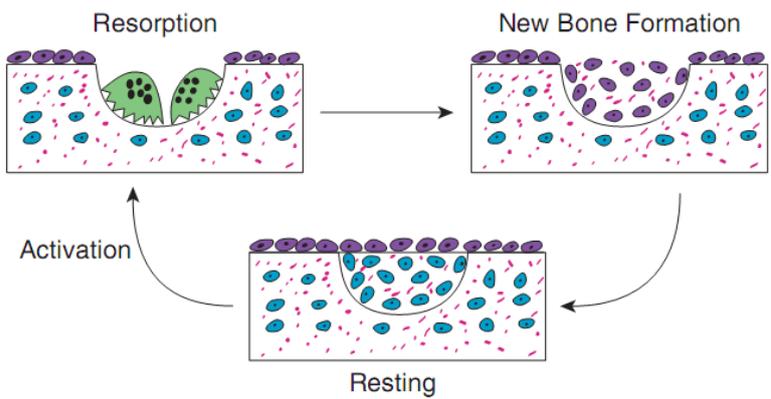


图 7. 骨的重塑。上，骨重塑循环。破骨细胞被激活以重吸收骨，形成吸收腔。破骨细胞然后消失且 MSCs 进入吸收腔内变成成骨细胞，并分泌骨基质。一旦填充进新骨，重塑区进入静止状态。最初的基质是有机物然后是机制的矿物质成分。下，HE 染色的幼儿骨切片，示骨被破骨细胞 Oc 侵蚀并在之后自发形成成骨细胞 Ob。

1、破骨细胞的起源和功能

破骨细胞是有 4-20 个细胞核的巨细胞，由巨噬细胞相互融合而来，并分化为移除骨基质的特殊功能。破骨细胞形成于骨面的结缔组织表面：骨周围膜和骨内膜。当有外界刺激时，如甲状旁腺激素

(parathyroid hormone, PTH), 破骨细胞在这些组织里便会释放引导巨噬细胞分化为破骨细胞的因子。两个因子在破骨细胞形成的过程中非常重要, 分别为巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating Factor, M-CSF) 和 Kappa B 因子激活受体配体 (receptor for activation of nuclear factor kappa B, RANKL)。M-CSF 结合到在巨噬细胞的受体 c-Fms 上。RANKL 是一个基质细胞表面因子, 结合到在巨噬细胞表面的 RANK 受体上 (RANKL receptor, RANK)。因此, 巨噬细胞分化为破骨细胞需要巨噬细胞和基质细胞的接触。RANKL 和 RANK 分别是 TNF 和 TNF 受体家族的。成骨细胞产生另一种可溶性蛋白 (osteoprotegerin, OPG) 与 RANK 竞争 RANKL 并抑制巨噬细胞分化为破骨细胞。破骨细胞分化通过 M-CSF、RANKL 与 OPG 之间的浓度平衡来调节。转录因子 c-Fos 是细胞内促进破骨细胞分子表达的关键因素。激活的破骨细胞使他们附着的基质细胞减少, 暴露出骨基质。破骨细胞通过脱矿质作用降解有机成分来吸收骨基质。破骨细胞出现极化, 并在一端形成膜。在膜周围的完整的圆圈将破骨细胞结合到骨基质上。通过离子转运泵, HCL 被释放入圆圈包围的空间内, 使 pH 值降低至 4.5 以下, 并溶解基质中的羟磷灰石。然后有机组织被溶酶体的蛋白酶、组织蛋白酶 K 和 MMPs 溶解掉, 形成骨内的溶解腔。然后破骨细胞通过凋亡而消失, 吸收腔被成骨细胞占据合成新的骨质。

2、骨塑形的控制

骨的吸收和再生受内分泌 (全身) 和生长因子 (局部) 控制。许多因子调控骨密度作用于成骨细胞或者通过直接影响成骨细胞的分化, 或者通过调节 M-CSF 和 RANKL 的产生, 并间接的影响成骨细胞的分化。

循环的激素对成骨细胞和破骨细胞有调节作用。持续的暴露于甲状旁腺激素 (PTH)、甲状旁腺激素-相关蛋白 (parathyroid hormone-related protein, PTHrP) 和低剂量的 1, 25 - 二羟基维生素 D₃ 刺激间质细胞, 包括表达 M-CSF 和 RANKL 的成骨细胞, 并引起破骨细胞的产生和骨的重吸收增加。甲状腺激素 (Thyroid hormone, T3) 和糖皮质激素也可增加骨的重吸收。糖皮质激素抑制钙的重吸收, 刺激甲状旁腺产生 PTH。T3 作用于成骨细胞甲状腺激素受体并刺激破骨细胞的分化。甲状腺刺激素 (Thyroid stimulating hormone, TSH) 在骨的重塑中起关键作用。在正常细胞中, TSH 抑制成骨细胞和破骨细胞的分化, 两者都在其表面表达 TSH 受体。破骨细胞分化的抑制是通过负向调节成骨细胞的 RANKL 和 TNF α 。成骨细胞的分化抑制是通过抑制在 Wnt 通路的 LRP-5 的表达。

性激素, 如雌二醇和睾酮, 通过减少 RANKL 的表达或者提高 OPG 的表达来抑制破骨细胞的分化, 从而减少骨再吸收。老年人中的骨质疏松症是因为产生的性激素减少引起的。在女性中, 因为停经

出现焦躁，此时女性骨质流失较严重，但在之后的时间内，男女骨质减少程度类似。间断性的 PTH 注射通过减少前体细胞刺激骨的再生而产生成骨细胞，维生素 D3 在高浓度时有同样的作用。胰岛素通过刺激氨基酸转移，合成 RNA，蛋白质合成和糖蛋白的合成来强化成骨细胞的作用。

瘦蛋白是一个重要的全身骨质调节因子，通过抑制下丘脑达到抑制骨的形成。瘦蛋白产生于脂肪细胞并通过结合到下丘脑受体来抑制食欲和抑制骨的形成。缺乏瘦蛋白或下丘脑受体的人或鼠变得肥胖，但是又高于正常的骨质重量。脑室内注射瘦蛋白可以减少肥胖并保持骨密度。瘦蛋白不直接影响成骨细胞，因为在成骨细胞上检测不到瘦蛋白受体。从下丘脑到骨的作用途径是交感神经系统，骨是由感觉和交感纤维进行神经支配的，与骨细胞直接交通并有一大类神经介质受体可在骨上检测到。交感神经产生去甲肾上腺素可结合成骨细胞上的 $\beta 2$ 肾上腺受体，骨中交感神经系统的维持需要雌激素。

Wnt 信号通路是在骨再生的局部控制中的关键因素。低水平的 Wnt 信号组成促进 MSCs 的增生。高水平则促进 MSCs 分化为成骨细胞。低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 受体相关蛋白 5 (LDL-receptor-related protein 5, LRP5) 在 MSCs 上与 Wnt 受体相作用而结合 Wnt1 和 Wnt3a。Lrp5 的突变减少 MSCs 的增生并降低骨密度。

骨再生在局部也受多种细胞素和生长因子调节，这些物质隐藏在骨骼发育的骨基质内。隐藏的生长因子释放于新形成的骨基质内，并可伴有骨的再生。骨骼细胞释放许多生长因子，而其他的从骨骼外细胞释放并被血液吸收。

第五节 组织损伤的修复机理

一、骨损伤的修复

在胚胎发育期，扁平骨（如颅骨）通过 MSCs 直接分化为成骨细胞，这一过程被称为膜内成骨。膜内骨的骨折也是通过 MSCs 在骨外膜内分化为成骨细胞修复。长骨表现出软骨内生长，如骨钙化的软骨板首先形成，而后被骨替代。软骨细胞增生并凋亡，释放血管源性信号引发骨外膜的毛细血管形成，同时破骨细胞蚕食钙化的基质。骨外膜的毛细血管和血管周围的 MSCs 侵入基质。部分 MSCs 分化为成骨细胞而以骨基质取代软骨基质，其他的形成骨内膜和基质，仍有一些以 MSCs 的形式存在于内膜和基质中。骨折后的长骨表现出膜内成和软骨内成骨的特点。

图 8 标示长骨的修复。骨和损伤皮肤的修复过程类似，区别在于骨修复是再生的过程，而非纤维化。再生伴随有骨外膜内 MSCs，较少见骨内膜和骨髓基质。骨折后，血管损伤导致局部形成血肿。缺氧导致在损伤两侧一定距离内的骨细胞死亡。血肿内的血小板可释放 PDGF 和 TGF- β ，引发

炎性反应，并有中性粒细胞和巨噬细胞侵入血肿。其中的一些巨噬细胞成为破骨细胞并降解坏死骨组织。在骨折几天后，骨外膜的 MSCs 在骨折两端分化为成骨细胞（直接骨化）。（成骨细胞分泌富含 I 型纤维蛋白原的骨基质并包含骨钙素，矿质素相关的糖蛋白骨粘连蛋白、骨桥蛋白和骨的唾液蛋白 II (bone sialoprotein II, BSP-II) 以及一些蛋白多糖。在骨折范围内，修复阶段在软骨板处表现出胚胎性软骨内骨发育。MSCs 在骨外膜、骨内膜和骨髓增生时形成软骨痂。这些 MSCs 增生并分化为软骨细胞，分泌由 II 型、XI 型纤维蛋白原、蛋白聚糖、透明质酸和纤连蛋白组成的软骨特异性基质 (Einhorn, 1998)。软骨细胞的增生过程中包含产生 X 型纤维蛋白原并下调其他纤维蛋白原型。因此，软骨基质被钙化，软骨细胞凋亡。破骨细胞在钙化的基质板清空基质，骨周围膜血管，并被增生的软骨产生的血管紧张素诱导侵入基质。侵入的血管伴随有 MSCs 分化为成骨细胞。骨基质在骨折修复的重吸收和合成被全身和局部的信号所维持。

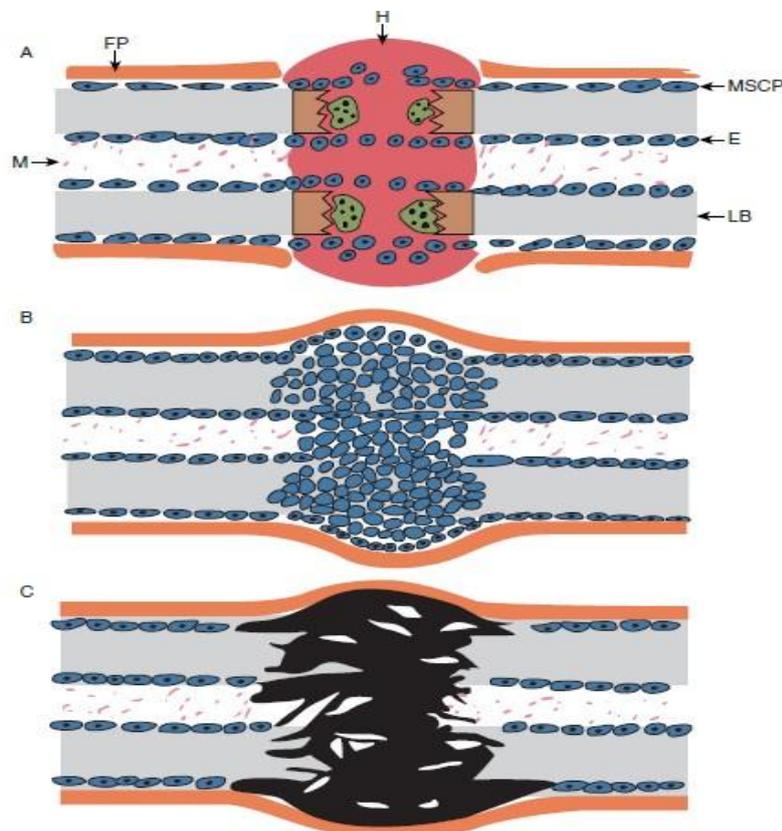


图 8. 骨折修复图。A. 骨折撕裂肌肉，骨外膜和血管，导致形成纤维蛋白凝块 H 出现在骨折腔附近，在骨折区附近的骨坏死区（棕灰色）被破骨细胞（绿色）降解。活的细胞 LB 为紫色。间质干细胞（蓝色）在骨外膜 MSCP 中和骨内膜 E 中被激活并迁移并增生。FP=骨外膜的纤维层。M=骨髓（红点）。 B. 间质干细胞增生形成软骨并取代纤维蛋白凝块。这些细胞分化为软骨细胞形成骨化板。 C. 血管侵入增生的软骨和成骨细胞并分泌新的骨基质。新骨在外侧覆盖旧骨出现在骨折的两端，这一过程直接出现于骨周围细胞膜 MSCs 而并没有软骨期。

二、 关节软骨的修复

关节软骨由透明质酸、多聚蛋白多糖、II 型胶原蛋白、少量的 IX 和 XI 型胶原蛋白组成的透明软骨。由于在基质中有高亲水性的透明质酸，软骨大约有 80%的湿重为水。透明软骨的结构使它具有弹性和硬度，并耐变形，对关节软骨的承重功能至关重要。关节软骨作用于长骨的骺端成为一个表面的生长区。生长区主要由两部分组成：表面区由 3-4 层扁平的软骨细胞组成，中间区由大的软骨细胞排列成柱状，在中间区之下是在骺端的内软骨区的钙化软骨。在生长期，软骨细胞在表面层的第三排并可分化为中间层的细胞，钙化区并最终形成内软骨。成年人表面区的软骨细胞停止在分裂中期，因此成年人关节软骨必须通过产生新的基质，而非新的细胞以弥补退变磨损。关节软骨没有血管，但因为基质中的水分含量高，很容易通过弥散作用从关节液中获得氧气和营养。

骨关节炎是与年龄或损伤相关的关节软骨的病变。在骨关节炎的发生和发展中有二种主要的病变。第一是基质钙化，从而减少了软骨细胞所需的营养和氧气的弥散，最终软骨细胞死亡，基质被重吸收。第二是软骨纤维化并沿着纤维走行分裂基质的软骨表面，使表面呈现毛糙。当发展到一定程度，骨骼暴露就会伴随疼痛。软骨的修复能力很低。影响软骨的损伤不会自动修复，因为损伤被无血管的软骨所隔离。损伤部位没有纤维蛋白血凝块，没有炎性反应，并且在损伤附近的软骨细胞不会再次进入细胞周期。而涉及骨的损伤往往表现出更好的修复，从骨中进入损伤的血可形成纤维蛋白凝血块及典型的炎性反应。损伤被骨及成纤维细胞中的 MSCs 修复，类似于皮肤上的结痂。但是，没有运动的修复是不良的。如果关节在修复过程中接受被动的运动，则修复较好。这是因为在运动中关节液提供更好的营养供给和排出废物，在这些条件下，可以形成更典型的透明软骨，但修复效果因人而异。

三、 骨骼肌的再生

骨骼肌是由多细胞核的肌纤维组成多股肌束融合形成。单独的肌纤维依靠单核成肌细胞的端端融合而形成多核体（图 9）。每个单核细胞被称作是一个肌小节的可收缩单位，以 Z 线分隔并将肌动蛋白纤维连接到肌小节末端。当肌动蛋白纤维沿着肌球蛋白向肌小节中央滑动时，肌小节长度缩短。肌纤维被肌束膜包裹形成肌束，肌束被肌外膜包裹形成肌肉组织。骨骼肌含有丰富的血管，肌鞘 存在的神经支配称作神经肌肉接合。在其两端，肌肉组织演变为筋膜或肌腱并连接到骨骼上。

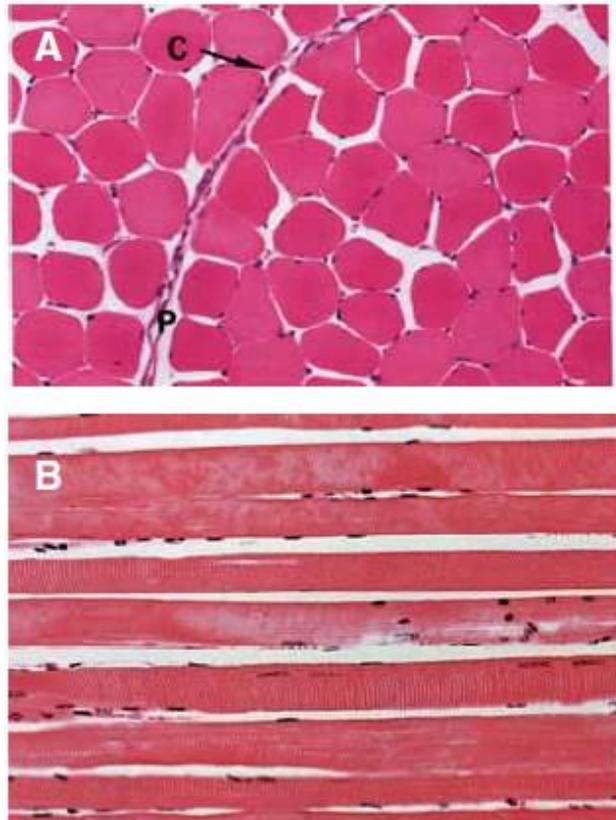


图 9. A. 骨骼肌横切面示单独的肌纤维。P=骨外膜包绕肌丝。C=毛细血管。注意肌细胞核位于周边（深染）。B. 骨骼肌纵切面。可见清晰的肌动蛋白-肌球蛋白复合体。

几乎所有脊椎动物在新生和成人骨骼肌中都含有一类干细胞-卫星细胞(satellite cells, SCs)，存在于肌膜和其上的基底膜之间。DNA 标记法证实其为损伤后肌肉组织再生的来源。卫星细胞占新生儿肌纤维细胞总和的 30%。这个比例随着年龄的增长而降低，在成年哺乳动物肌组织中占 1-5%。卫星细胞增殖的动力学研究表明，原始的卫星细胞具有再生骨骼肌纤维的能力。张力对肌纤维的生长很重要。一整条肌肉可从鸡或鼠的较短的肌肉根部再生出来，在鼠中，腓肠肌的残端延长与有功能性的 Achilles 腱再生相关。施加于肌肉残端的张力被认为是肌肉再生重要的因素。肌纤维的再生在移植 1 周后表现出朝向末端的自发收缩。再生肌肉在移植的第 2 周后开始重新获得神经支配，收缩速度在移植后持续增加，直到 30 至 40 天后达到正常。去神经化可以抑制或者延迟再生肌纤维的结构和功能性分化。

肌腱和韧带都是有强大拉伸力的致密结缔组织（图 10）。肌腱将肌肉附着到骨骼上，而韧带稳定关节并限制其正常的运动范围。二者都由平滑肌纤维细胞组成，这类细胞分泌由平行的胶原蛋白 I 和 II 纤维束并伴有低分子量的皮肤素硫酸钠 PG 组成的细胞外间质。PG 组分调节胶原蛋白束的大

小和排列使其与之直径相协调。胶原蛋白纤维在肌腱放松时呈波浪状，代表着松懈状态。在发育时期，肌腱和韧带有良好的血液供应，但是在成年人中，毛细血管血供则很少。一些靠近骨骼的肌腱（如 Achilles 腱）被两层致密的和不规则的结缔组织所包围。外层连接于环绕它的结构，内层紧紧连接于肌腱。在两层之间有一个充满 HA 润滑液（类似于关节液）的腔隙，使内肌腱鞘在外层内滑动。韧带血管层覆盖表面，并融合成骨的骨周围膜。

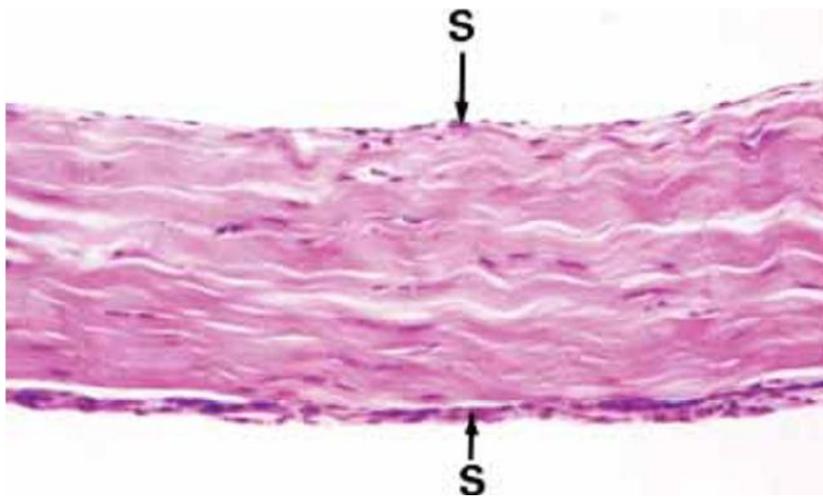


图 10. 肌腱的纵行切片。在肌腱中的胶原蛋白纤维表现出波纹状的特性。肌腱内不存在细胞。S=肌腱鞘和覆盖有可产生滑囊液的滑膜 S，允许肌腱在鞘内滑动。

肌腱和韧带常见有两类损伤：撕裂和破损。在最初的炎性期，成纤维细胞增生并产生纤维蛋白原纤维。在几周内，它们排列顺序沿着肌腱或者韧带的长轴形成痂样结构。随着张力的增加，瘢痕开始重建并使纤维蛋白原与肌腱或者韧带的长轴平行。这样的纤维线性排列对恢复肌腱的功能至关重要，因此，在修复的过程中，肌腱的原始结构得到重新塑造。损伤的肌腱具有自我修复的能力，在及时处理的前提下，其结构和功能可恢复至基本正常的水平。修复过程受肌腱内层鞘上的成纤维细胞或者从周围结缔组织迁移过来的成纤维细胞的影响。在有鞘的肌腱上，内层鞘与再生的肌腱接触并从外层分离，使其恢复滑动功能。韧带在关节损伤中亦可能受到破坏，导致部分或全层断裂。单独的内侧联合韧带损伤可以在没有外科干预的条件下自行愈合，但是前后交叉韧带愈合较差。

四、小 结

骨骼肌和骨在损伤后再生良好。肌腱和韧带瘢痕愈合后与原组织类似，但强度下降。软骨和半月板再生不良或者根本不再生。介导骨骼肌再生的是在肌纤维基底细胞膜上的卫星细胞，这些细胞存在于肌纤维中并自我更新。骨是一个动态的组织，通过破骨细胞对骨基质的再吸收和成骨细胞的

再生不断地进行重塑。破骨细胞是来源于巨噬细胞的多核细胞。骨的重塑在全身和局部控制途径下促进或抑制成骨细胞和破骨细胞的分化。一些全身性的激素途径也参与了骨的重塑。PTH、PTHrP 和 $1, 25\text{-OH}_2$ 维生素 D3 通过刺激基质细胞表达 M-CSF 和 RANKL 来增加骨的重吸收，从而增加破骨细胞的分化。

当长骨骨折时，在骨折区形成纤维蛋白血凝块填充骨折区，接着是炎性反应。由于不形成瘢痕，骨再生类似于软骨内成骨形成于软骨板。在骨外膜、内膜和骨髓中的 MSCs 增生并分化为软骨并替代骨。局灶的骨折修复分子介质与在软骨内成骨的发生和重塑的介质是一致的。关节软骨与骨不同，如果损伤没有累及至骨，根本不会再生。如果损伤累及骨可以刺激纤维软骨修复过程迁移至伤处。幼儿的关节软骨可再生是因为软骨细胞仍可再分化。成人的软骨细胞不会增生可能是由于其抑制因子的作用。人的肌腱具有自主修复的能力。肌腱鞘的成纤维细胞可以影响修复，成纤维细胞形成的胶原蛋白纤维最初是无序排列的，之后沿着肌腱的长轴排列并再生，形成类似于瘢痕样的肌腱结构。韧带与肌腱在结构上类似，并以相似的方式再生。即使是再生良好的情况下，再生的韧带也只能恢复到原来 50% 的承重能力。

第六节 两栖动物的肢体再生与启示

一、两栖动物的肢体再生

在自然界，有一些脊椎动物，通过芽基细胞的增殖，能够在切割伤的残余附肢部分组织或整个附肢进行再生，这种再生过程是通过芽基完成的。芽基是通过伤口处一种成熟细胞去分化形成的，在低等动物可以完成有限的肢体再生。

许多物种的幼虫、成体蝾螈以及早期青蛙和蟾蜍，蝌蚪等的肢体可以再生。成体蝾螈肢体的截肢表面会在几个小时内就被迁移的表皮覆盖。在受伤的表皮下，去分化的细胞聚集形成再生芽基。与此同时，受伤表皮增厚形成尖端表皮帽样组织 (apical epidermal cap, AEC)。AEC 的外层形成保护层，而其基底层的解剖和功能结构则与羊膜胚胎肢芽外胚层嵴尖相似。在截肢后的几天里，毛细血管和神经的再生开始形成，并进入芽基细胞中。在芽基细胞的生长和增殖中，无论是 AEC 还是再生神经提供的生长和营养因子都起到至关重要的作用。

90% 的成体蝾螈通过再生可以精确的复制原来的断肢。但是，如果连续截肢再生的话，其结果就会影响其形态学上的精确性。成体蝾螈的上臂在 4 次的截肢再生后，有 81% 的再生肢体显示出了结构的异常，如趾尖蹼，骨骼元素数量在减少，甚至会出现完全再生抑制。芽基是由位于截肢表面

的细胞外基质降解形成，结果造成组织溶解和个体细胞的游离，进而导致显性表型的丢失和细胞的增殖。不管其亲代细胞表型如何，芽基细胞呈现出肢芽间充质细胞的形态学表现。芽基干细胞的存活和增殖需要受一些内分泌激素代谢影响，主要是胰岛素，生长激素，氢化可的松，和甲状腺素等，但是也高度依赖一些 AEC 尖端表皮帽产生的特殊因子 和芽基的神经物质。

如果截肢肢体如果同时伴有切断脊神经 III、IV 和 V 而完全失去神经支配，不能阻止受伤表皮迁移，组织溶解或者去分化。但是，去分化细胞不发生有丝分裂，芽基也不能够形成。去神经支配不改变蛋白质合成模式，但是抑制了 RNA 和蛋白质的合成。再生神经纤维和芽基细胞的关系是相辅相成的。再生的神经纤维进入芽基需要依赖几种芽基细胞产生的因子，如脑源性神经营养因子(BDNF)，神经营养因子 3 和 4 (NT 3,4)，胶质细胞衍生的神经营养因子 (GDNF)，肝细胞生长因子/离散因子 (HGF/SF) 可以代替部分芽基组织在促进轴突再生的过程中作用。这些因子均由施旺细胞产生，可以在哺乳动物再生末梢神经的过程中促进神经存活和轴突生长。轴突比芽基组织生长能力更强，提示其他不明来源的因子可能是由芽基细胞产生并促进神经存活和轴突生长。

再生能力与免疫系统的成熟相关，而这可能是导致再生能力丢失的最大原因。在再生能力强的早期的青蛙蝌蚪和幼虫中的炎症免疫应答是不存在的或者是极微量的。然而在成虫爪蟾中，它的炎症免疫应答同哺乳动物类似。免疫系统的差别主要表现在他们对皮肤移植的反应。蝌蚪可以接受微小的组织相容性的错配的皮肤移植，然而青蛙却不能。很有可能，成年炎症反应通过早期基膜和纤维组织的免疫沉淀阻止了青蛙肢体再生组织相互作用。

二、哺乳动物肢体的再生

有几种哺乳动物能够通过切割处再生来代替它们的肢体和下颚。鹿、麋鹿和驼鹿可再生鹿茸，兔子可再生耳组织。小鼠，兔子和人均能再生指尖。这些现象提供了研究附件再生能力的模型。很多两栖动物肢体再生需要截断面真皮、软骨和肌肉细胞去分化的芽基形成。无尾动物的两栖动物随着它们从蝌蚪到青蛙的转变过程，他们失去再生的能力。在幼蛙和成年蛙中诱导芽基形成很困难，有证据表明，改变组织环境，特别是免疫系统，是改变再生能力的主要原因。成年鼠和人类可维持末梢指骨再生的能力，指尖再生是通过直接的骨沉积，而不是通过芽基。已证明截肢后，试着诱导成年末梢骨的再生，通过近端骨刺激、胰蛋白酶和电流作用都失败。近年有报道牵张力的刺激可以激活并维持肢体的再生能力。在骨细胞的代谢过程中，骨细胞内的很多基因是被机械力学刺激来调控表达的。在牵拉成骨的过程中，骨形成蛋白基因的表达的变化以及细胞增生与凋亡的变化可能是调节骨形成的因素之一。高频率的张力能够促进骨的改建，而低频度的张力能够促进骨的形成。牵

拉成骨技术不但能够增加新生骨组织内的局部血管生成，同时也能够激发全身骨骼系统内增加血管生成因子和它受体的高表达。

三、人类肢体的自然再生现象

成年哺乳动物末梢指骨的再生能力首次在人类身上得到验证。有一些孩子们的指尖断指后的再生病例报道。手指和脚趾末端的指骨再生也在成年人身上发生（图 11）。值得注意的是，再生仅仅发生在伤口曝露的情况下，而不在截肢表面皮肤闭合的情况下。由于开放性伤口的表皮明显愈合，说明上皮间充质的相互作用是成人和其他哺乳动物指尖再生的必要条件，就如同两栖动物肢体再生。

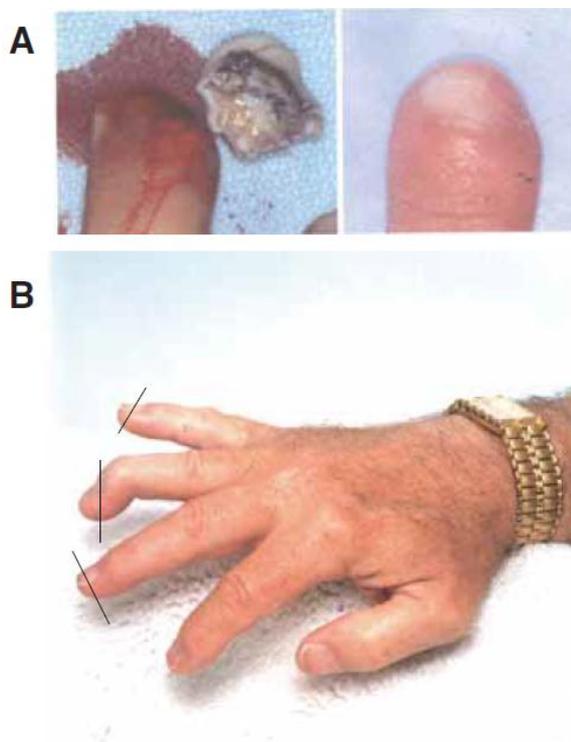


图 11. 人及儿童指尖再生。(A)左，七岁的女孩的指尖在一次自行车事故中被截断，没有进行缝合和换敷料治疗。右，指尖在八周内再生。(B)一个七十六岁老人的 3, 4, 5 指尖在 29 岁时的一次机械事故中被截断后，未经任何治疗再生。划线部分显示的是当时截断的部位。

胎鼠的再生末梢肢体的能力可以保持到成年。Borgens 将 4 周大的老鼠的中趾近端截断，截趾的中趾在 4 周时间内再生并且看似正常，其外观和形态学结构均正常。如果截肢水平面是近侧端的关节，则趾再生不会发生，人类的指尖再生也是如此。尽管胎鼠的指尖再生末梢指骨是由软骨完成的，成人指尖则是由骨沉积到剩余骨后直接再生的。成纤维细胞在截肢部位参与再生指骨，他们可

能改造真皮，骨膜，结缔组织，骨和脂肪的形成。甲母质，甲床和甲板则从表皮再生而来。小鼠指尖的血管供应较丰富而利于再生，甲上皮和其他一些上皮间充质为再生提供细胞来源

四、展望

两栖动物能够通过切割处再生来代替它们的肢体和下颚。鹿、麋鹿和驼鹿可再生鹿茸，兔子可再生耳组织。小鼠，兔子和人均能再生指尖。这些现象提供了研究附件再生能力的模型。很多两栖动物肢体再生需要截断面真皮、软骨和肌肉细胞去分化的芽基形成。无尾动物的两栖动物随着它们从蝌蚪到青蛙的转变过程，他们失去再生的能力。在幼蛙和成年蛙中诱导芽基形成很困难，有证据表明，改变组织环境，特别是免疫系统，是改变再生能力的主要原因。

成年鼠和人类可维持末梢指骨再生的能力，指尖再生是通过直接的骨沉积，而不是通过芽基。已证明截肢后，试着诱导成年末梢骨的再生，通过近端骨刺激、胰蛋白酶和电流作用都失败。近年有报道牵张力的刺激可以激活并维持肢体的再生能力。在骨细胞的代谢过程中，骨细胞内的很多基因是被机械力学刺激来调控表达的。在牵拉成骨的过程中，骨形成蛋白基因的表达的变化以及细胞增生与凋亡的变化可能是调节骨形成的因素之一。高频率的张力能够促进骨的改建，而低频度的张力能够促进骨的形成。牵拉成骨技术不但能够增加新生骨组织内的局部血管生成，同时也能够激发全身骨骼系统内增加血管生成因子和它受体的高表达。

参考文献

1. Allbrook D (1981) Skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve* 4:234–245.
2. Alliston T, Derynck R (2002) Interfering with bone remodeling. *Nature* 416:686–687.
3. Akiyama T (2000) Wnt/b-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11(4):273-282.
4. Asai J, Takenaka H, Kusano KF, Ii M, Luedemann C, Curry C, Eaton E, Iwakura A, Tsutsumi Y, Hamada H, Kishimoto S, Thorne T, Kishore R, Losordo DW (2006) Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. *Circulation*,113(20):2413-2424.
5. Boyle WJ, Simonet S, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337–342.
6. Burr DB, Robling AG, Turner CH (2002) Effects of biomechanical stress on bones in animals. *Bone* 30:781–786.

7. Canalis E, McCarthy T, Centrella M (1988) Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest* 81:277–281.
8. Chenu C (2004) Role of innervation in the control of bone remodeling. *J Musculoskel Neuron Interact* 4:132–134.
9. Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE (2005) Stem cell function, self-renewal and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 122:289–301.
10. DeBoer J, Wang HJ, van Blitterswijk C (2004) Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tiss Eng* 10:393–401.
11. Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C, Karsenty G (2005) Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 434:514–520.
12. Elmquist JK, Strewler GJ (2005) Do neural signals remodel bone? *Nature* 434:447–448.
13. Fathke C, Wilson L, Shah K, Kim B, Hocking A, Moon R, Isik F (2006) Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing. *BMC Cell Biol*, 7:4
14. Filvaroff E, Erlebacher A, Ye J-Q, Gitelman SE, Lotz J, Heillman M, Derynck R (1999) Inhibition of TGF- β receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass. *Development* 126:4267–4279.
15. Gridley T (2001) Notch signaling during vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(10):5377-5378.
16. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407:530–535.
17. Teitelbaum SL (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289:1504–1508.
18. Zammit PS, Heslop L, Hudon V, Rosenblatt JD, Tajbakhsh S, Buckingham ME, Beauchamp JR, Partridge TA (2002) Kineticsof myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate muscle. *Exp Cell Res* 281:39–49.
19. Chow JW, Wilson AJ, Chamber TJ, Fox SW (1998) Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13 week old rats. *J Bone Miner Res*, 13:1760-1767.
20. Johnson RL, Tabin CJ (1997) Molecular models for vertebrate limb development. *Cell*, 90:979-990.