

载荷诱导骨生长的力学细胞生物学机制

张毅奕 陶祖莱

中国科学院力学研究所, 北京 100080

摘要 骨骼的结构和功能在很大程度上依赖于其所处的力学环境, 这一观点已被广为接受. 自从 Wolff 提出其著名的骨转换定律以来, 骨生长与载荷间的关系一直是生物力学中一个重要的问题. 大量的动物实验均证明二者之间存在明确的关联. 然而, 载荷诱导骨生长的力学细胞生物学 (mechanocytobiology) 机制仍很不清楚. 十余年来体外培养骨骼细胞加载的研究为应力 (应变) 诱导骨生长提供了一个微观理论框架. 目前认为, 载荷诱导骨生长的过程可分为四个环节, 即: 力学耦联、生物化学耦联、胞间信号转导和效应细胞反应. 详细阐述了这几个环节, 并就今后的研究方向作一讨论.

关键词 力学细胞生物学, 应力与生长, 骨骼细胞, 信号转导

1 前言

与其他组织一样, 骨骼的质量和形态发生决定于其基因背景, 但其结构和功能在很大程度上依赖于其所处的力学环境, 这一观点已被广为接受. 事实上, 早在 19 世纪, 人们便已注意到机械力与骨骼结构之间的关系. 其中, Julius Wolff^[1] 的名字最为著名. 基于 Meyer 对松质骨的形态学研究, Wolff 提出机械应力决定骨骼的结构这一观点, 即骨对外界载荷具有顺应反应 (adaptation) 的能力. 他指出骨骼的结构与所受应力之间存在确切的对应关系, 即所谓的 Wolff 骨转换定律, 简称 Wolff 定律. 今天, Wolff 的一些观点如骨生长只能发生在骨间隙中 (interstitial space) 已被证明是错误的^[2], 但机械应力可影响骨骼的形状与结构却是不争的事实, 大量的实验研究证明了这一点. 宇航失重环境可导致骨生成^[3]、矿物质含量^[4]以及骨基质蛋白合成^[5]的减少. 长期卧床后, 人体 Ca^{2+} 含量和骨骼重量显著减少^[6], 密质骨矿物质沉积速度显著降低^[7]. 相反, 通过锻炼增加骨骼载荷, 可增加骨重量^[8]并减少妇女绝经后骨质疏松的发生^[9]. 大量的动物实验也表明, 骨密度和骨 Ca^{2+} 平衡^[10~13] 等也受到载荷状况的影响. 这些 80 年代的组织学水平研究雄辩地表明, 载荷确实与骨的生长密切相关. 为了解释这些实验现象, 研究人员提出了各种各样的假说, 包括应力大小理论、应变能-骨密度理论、骨表面重建理论、力电效应理论、骨显微裂纹理论和力学稳态 (Mechanostat) 理论等. 其中, 以 Frost 提出的力学稳态理论^[14] 可能最为符合生理状态.

力学稳态理论描述了骨骼结构的变化与应变状态之间的反馈关系. 该理论的核心观点为: 骨骼结构在载荷作用下趋向于进行相应的变化以维持应变处于假定的生理范围. 当应变处于生理范围时, 骨吸收与骨形成速度相等, 骨量维持平衡; 应变超过生理范围上限即达到过度载荷时, 骨形成速度大于骨吸收速度, 骨骼进行塑建 (modeling) 即在骨表面形成板层骨, 从而降低

收稿日期: 1999-06-25, 修回日期: 2000-01-04

局部应变；如应变大到病理过度载荷状态，骨表面形成编织骨；而当应变小于生理下限时，骨吸收速度大于骨形成速度，骨骼进行重建 (remodeling) 即被吸收，从而使局部应变增大到生理范围。Frost 还认为，某些激素和生化物质可欺骗力学稳态机制，从而允许生理范围应变条件下骨骼质量和结构的显著变化。力学稳态理论的独到之处在于描述了骨塑建和骨重建以及板层骨和编织骨形成所需应变诱导条件的差异。

虽然力学稳态理论较好地阐明了 Wolff 定律并有了很大的进步，然而该理论仅仅是根据组织学水平研究推导而来，至于应力究竟如何改变骨骼结构和功能的微观机制并没有给出解释。所以，我们仍然要回答 Wolff 遗留下来的问题：什么样的微观机制使得骨骼这样适于使用？

近年来，生物力学领域同时向宏观与微观两个方向发展。其中，微观方向的一个分支就是研究在外力作用下细胞生长、分化等过程的变化及其在组织基调 (tissue tone) 调节中的作用，即所谓的力学细胞生物学 (mechanocytobiology)。

进入 90 年代以来，为了进一步理解 Wolff 定律，借助于力学细胞生物学的思想和方法，研究由动物实验即组织水平深入到细胞水平和分子水平，从而在认识载荷诱导骨生长的微观机制的道路上前进了一大步。目前认为，载荷诱导骨生长可分为四个过程：(1) 力学耦联，即宏观的力作用在骨骼局部产生力学微环境，该力学微环境取决于骨局部的解剖结构和力学特性；(2) 生物化学耦联，即具有力感受功能的骨骼细胞 (主要是骨细胞) 感受力学微环境的变化，并将力信号转化为生物化学信号，最终导致基因表达的变化；(3) 细胞间信号转导，即感受细胞到效应细胞 (指成骨细胞和破骨细胞) 的信号转导；(4) 效应细胞的反应，即应力诱导的骨塑建和骨重建活动。本文将就这几方面的研究作一详细介绍，并对今后的研究方向作一讨论。

2 骨骼的成分和结构

骨骼由细胞和细胞间质构成。其中，细胞又可分为骨原细胞、成骨细胞、骨细胞、破骨细胞等多种类型。骨原细胞是成骨细胞的前体细胞，可分化形成成骨细胞。成骨细胞可分泌并钙化骨基质。包埋在骨基质中的成骨细胞即分化形成骨细胞，位于骨陷窝中，并有大量的细胞突起通过骨小管彼此相连。这三种细胞统称为成骨细胞系细胞，负责骨的形成和维持。破骨细胞由多个单核细胞融合而成，可向骨基质中分泌蛋白酶和一些酸性物质，具有降解骨组织的能力，主要负责骨的吸收和重建。

骨骼是一高度结构化的器官 (参见图 1)。成熟骨骼的微观结构可表现为松质骨和密质骨两种形式。松质骨分布在骨骺处和骨干内表面，呈针状或片状，称作骨小梁。骨小梁按应力方向规则排列，形成海绵状结构。密质骨分布在骨干处，表现为四种结构方式：外环骨板、内环骨板、骨单位、间骨板。其中，骨单位与载荷诱导的骨生长关系最为密切。骨单位又称 Haversian 系统，由 10~20 层骨板以同心圆方式排列成筒状，轴心是纵行的 Haversian 管 (又称中央管)，内含毛细血管和神经。纵行的 Haversian 管由横行的 Volkman 管 (又称穿通管) 相连，形成复杂的管道系统。骨小管也与该管道系统相连。

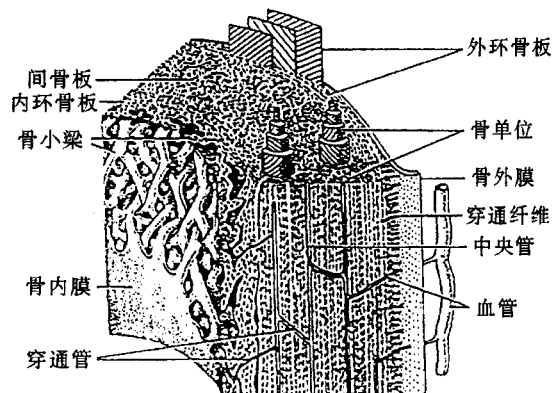


图 1 长骨骨干结构模式图

3 力学耦联 (Mechanocoupling)

广义来说，力学耦联指力敏感 (mechanosensitive) 组织将宏观的载荷转变为细胞可以感受

的一种或几种形式的能量的过程. 例如, 中耳的骨头可将空气中的声波转变为耳蜗中的应力波. 对骨组织而言, 正常生理活动施加于其上的载荷可导致骨骼局部的变形, 即应变、微观损伤、压电电位、骨小管内液体流动和流动电位. 骨骼局部的应变是载荷作用的直接结果.

在不同的活动条件下, 人骨骼应变范围为 $400\sim 2000\ \mu\text{strain}$ ^[15,16] ($1\ \mu\text{strain}$ 等于每米长度上发生 $1\ \mu\text{m}$ 的变形). 长骨上的正常载荷可在骨表面形成很大的应变梯度^[17,18]. 骨的顺应反应程度与应变的峰值强度有关^[19]. 在体实验表明, 静态载荷对骨生成没有作用^[10,20], 而峰值强度大于 $1000\ \mu\text{strain}$ 的动态载荷可显著刺激骨的生成^[12,21].

当应变超过一定强度后, 骨基质中可形成微观损伤, 表现为微裂隙和蠕变损伤. 微裂隙的积累需要上千个加载循环^[22], 而蠕变损伤的产生主要取决于很高的应变强度^[23]. 虽然曾有文献报道骨骼中的微观损伤可驱动骨的顺应反应^[24,25], 但大量的载荷诱导骨生长的实验所采用的实验条件足以排除微裂隙和蠕变损伤的存在, 所以微观损伤可能并非载荷诱导骨生长的主要生理因素, 而更可能是一种病理因素.

骨的应变可在骨内部产生电位变化, 包括压电电位和流动电位. Fukada 等人发现, 干骨具有压电现象, 且证明该现象由骨中的胶原纤维产生^[26]. Becker 和 Murray 报道, 电场能够激活蛙成骨细胞^[27]. 然而, 湿骨在弯曲应力作用下压电电位很小^[28], 所以压电效应可能不是生理状态下应力诱导骨生长的主要因素. 至于流动电位, 则是源于骨小管内液体的流动. 应变的空间梯度可在骨小管内生成压力梯度, 从而驱动骨小管内液体的流动^[29]. 骨的表面(包括骨小管表面)本身荷有负电荷, 骨小管内的液体流经该负电表面时, 液体中的带有正电荷的粒子将不断吸附到骨表面上, 从而形成沿流动方向电位差^[30]. McLeod 等人报道, 给在体骨骼施加电磁场可促进骨形成而抑制骨吸收^[31]. 这些结果表明载荷诱导的电位变化可能是骨顺应反应的机制.

除了产生流动电位以外, 骨小管内液体的流动还将在骨小管管壁细胞上施加剪应力. 理论分析表明, 该剪应力范围在 $0.8\sim 3\ \text{Pa}$, 与血液流动施加在血管内皮细胞上的剪应力水平大致相当^[29]. 若干组织水平的研究表明, 液体流动与骨质量的增加有关^[32,33]. 此外, 有实验证据表明, 液体流动对成骨细胞的作用由剪应力介导, 而非由流动电位变化驱动^[34,35]. 所以, 目前倾向于认为流体剪应力是驱动骨生长的直接力学因素(参见图 2), 而电位变化在骨顺应反应中的作用仍需进一步研究.

不论骨的顺应反应究竟由上述的哪一种或哪几种力学因素引发, 应变参数都起到重要作用. 上文已提到, 只有动态载荷才能诱导骨生成^[10,12,20,21]. 此外, 骨生长的程度与应变峰值和加载频率有关. Turner 等人报道, 当动态加载频率小于 $0.5\ \text{Hz}$ 时, 载荷不能诱导骨生成, 而当动态加载频率为 $2.0\ \text{Hz}$ 时, 骨生成的速度可增加 4 倍^[10]. 应变导致的骨小管内液体流动速度也与应变率密切相关, 前者随后者的增加而增加^[10,36].

为了明确载荷诱导骨生长的细胞机制, 模拟在体骨骼细胞力学环境的体外培养细胞加载实验是必须的. 迄今为止, 文献已经报道的方法有: 低渗肿胀、静水压、机械牵拉、双向膜牵拉和

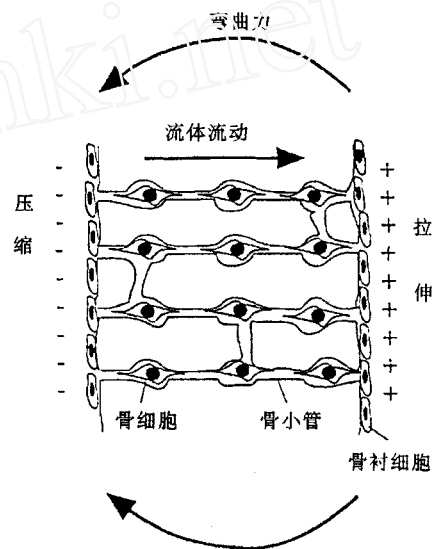


图 2 弯曲载荷作用下的密质骨或骨小梁示意图. 弯曲使骨一侧产生压应力, 另一侧产生张应力, 从而在骨小管中产生压力梯度, 驱动骨小管中液体从压力侧向张力侧流动. 液体流动可在骨细胞表面施加剪应力^[13]

流体剪应力。其中应用最多的是机械牵拉和流体剪应力。

4 生物化学耦联 (Biochemical coupling)

所谓生物化学耦联, 就是骨骼细胞感受其微环境中的力信号并将该信号转变为细胞内一系列的生物化学反应的过程。该过程可分为 3 个阶段: (1) 应力的感受; (2) 生物学信号的产生及胞内信号转导; (3) 基因表达的变化。

4.1 应力的感受

4.1.1 应力感受细胞

骨骼内含有多种细胞成分。基于这样一个事实, 即载荷可诱导骨骼质量的显著增加, 成骨细胞自然而然地被认为是骨骼细胞中感受应力并作出反应的细胞。基于这种假设, 进行了大量的以离体培养的成骨细胞为对象的体外加载实验。包括机械变形应力和流体剪应力。结果表明, 这两种加载方式均可使成骨细胞胞内环腺苷酸 (cAMP) 和三磷酸肌醇 (IP₃) 水平增高^[34,37~39]。此外, 成骨细胞的增殖加快^[40]、胞外基质蛋白^[41]和前列腺素 E₂ (PGE₂)^[42,43]的合成增多。这表明, 成骨细胞确实可以感受力的作用并将其转化为生物化学信号。然而, 活性状态的成骨细胞只占成年人骨表面的 5%, 94% 的骨表面为骨细胞和骨衬细胞覆盖 (还有 1% 是破骨细胞)^[44,45], 因此, 活性状态的成骨细胞单独不足以介导骨的顺应反应 (表现为骨质量的显著增加)。实验表明, 骨细胞可对载荷作出反应, 包括 ³H 尿嘧啶掺入增加^[46]、6-磷酸葡萄糖脱氢酶^[47]和碱性磷酸酶^[48]活性的上调等。这些结果表明, 骨细胞可能是主要的应力感受细胞。Klein-Nulend 等人的工作表明, 骨细胞对剪应力作用的敏感性要高于成骨细胞^[49], 从而为这种观点提供了有力的实验证据。然而, 由于骨细胞本身不能增殖也不能合成新生骨基质, 所以可能存在某种旁分泌机制以调节骨的生成。目前认为, 骨细胞是主要的应力感受细胞, 在应力作用下, 这些细胞可分泌旁分泌因子作用于成骨细胞使其激活, 从而诱导骨生成^[13]。

4.1.2 应力感受机制

从上述力学耦联过程可知, 载荷可在骨骼局部产生多种力学因素的变化。不论究竟是哪一种或哪几种力学因素最终诱导骨的生成, 都不能避免这样一个问题——力学信号究竟如何转化为生物化学信号? 现有的文献报道表明: 若干机制可能是这个问题的答案, 包括: (1) 胞外基质分子-整合素-细胞骨架-核基质系统; (2) 力敏感离子通道; (3) G 蛋白耦联的受体。

(1) 胞外基质分子-整合素-细胞骨架-核基质系统

绝大部分在体哺乳动物细胞 (血液细胞除外) 均需粘附于一定的基质表面才能存活。细胞-胞外基质以及细胞-细胞之间的粘附是通过细胞膜上称作整合素的糖蛋白介导的。整合素的胞内结构域可与肌动蛋白细胞骨架相连接, 该连接需要有肌动蛋白结合蛋白如 vinculin、talin 和 α -actinin 的参与。细胞骨架以网络的形式存在, 将胞外基质分子和核基质以及胞内成分连接在一起。理论模型和实验证据表明, 细胞骨架可施加张力于胞外基质^[50~52]。由于细胞骨架的张力, 外界力的刺激可迅速传递到细胞核, 并可能调节细胞内基因的表达。事实上, 有实验证据表明, 细胞粘附在细胞的增殖、分化、形态发生以及基因表达中有重要的作用^[52,53]。成骨细胞与破骨细胞的募集和/或分化同样受到细胞与胞外基质粘附行为的调节^[54,55]。Pavalko 等人将 α -actinin 的蛋白裂解片段用显微注射的方法引入到 MC3T3-E1 成骨肉瘤细胞中, 发现剪应力诱导的细胞骨架重排和基因表达变化被阻断^[56]。所使用的 α -actinin 片段保持与整合素结合的能力, 但不再与 actin 结合, 从而竞争抑制了内源性 α -actinin 与整合素的结合, 并因此打断整合素和细胞骨架的联系^[57]。这表明: 胞外基质-整合素-细胞骨架系统在力转导 (mechanotransduction, 即力信号 \rightarrow 生物信号的转化) 中起重要作用。细胞骨架在骨骼细胞力转导中的作用的另一个重要证据是核基质蛋白-2 (NMP-2)^[58]。NMP-2 是成骨细胞特有的一种蛋白质, 可特异地结合于骨组织特有的蛋白质骨钙素编码基因启动子中的一段序列^[58]。进一步的研究表明, NMP-2 是 AML/CBF/PEBP2/Runt Domain 转录因子家族的成员^[59], 为细胞骨架调节基因表达提供了分

子生物学证据.

(2) 力敏感离子通道

自从 1984 年 Guharay 和 Sachs^[60] 首次报道机械牵拉可以激活离子通道以来, 力转导就被认为是这类通道的主要功能. 力敏感离子通道是生物化学耦联的非常可能的机制, 因为其激活无须第二信使分子的参与^[61]. 已有报道大鼠^[62] 和人^[63] 成骨细胞样细胞 (osteoblast-like cell) 的细胞膜上含有牵拉激活的阳离子非选择性通道 (SA-cat). 实验表明, 长期的间歇机械牵拉可以增高大鼠成骨细胞样细胞中 SA-cat 通道的活性和电导值^[64]. 此外, 机械牵拉可以使这些通道对牵拉激活变得更为敏感并可诱导自发的通道激活. Guharay 和 Sachs^[60] 曾经假设, 虽然机械应变导致的膜张力的变化可以激活 SA-cat, 但是膜张力的变化是经由细胞骨架聚集到 SA-cat 上的. 然而破坏鸡骨骼肌细胞的细胞骨架的实验表明, 微管和微丝与 SA-cat 并没有关联. 但 Duncan 和 Turner 研究小组的工作表明, SA-cat 与微丝有着密切的联系^[65].

除了 SA-cat 外, 成骨细胞上还有其他的一些离子通道可能会参与成骨细胞对机械刺激的反应. Olesen 等人报道血管内皮细胞上存在一种对流体剪应力敏感的 K^+ 离子选择性通道^[66]. 该通道可为流动迅速激活, 并始终保持开放状态直至流动停止. Ypey 等人的工作表明, 成骨细胞上也存在有 K^+ 通道^[67], 但其对力的敏感性尚未见报道.

(3) G 蛋白耦联受体

此处所说受体与传统意义上的受体并不相同, 并没有已知的相应配体. 目前对这种受体的化学成分、理化性质等尚一无所知. 但是, G 蛋白的抑制剂如 GDP β S 可以抑制载荷, 如机械变形或剪应力诱导的成骨细胞以及骨细胞的效应, 表明 G 蛋白耦联的力感受机制的存在.

4.2 生物学信号的产生及胞内信号转导

经过初始的感受, 成骨细胞和骨细胞可生成一系列的第二信使分子. 目前尚未发现力转化所特有的信号转导途径, 而是与传统的第二信使分子联系在一起. 下面介绍目前已知的力转化所涉及的第二信使分子.

Jones 等人于 1991 年报道, 5000 μ strain 的牵拉可使成骨细胞胞内 Ca^{2+} 浓度 (100 ms) 立即增高达 17 倍之多^[68]. 以后多篇文章报道成骨细胞胞内 Ca^{2+} 浓度在牵拉或剪应力作用下迅速增高^[64,69]. 事实上, 胞内 Ca^{2+} 浓度的增高也是其他一些力敏感细胞如血管内皮细胞对机械刺激的一种反应^[70]. Duncan 等人的工作表明, 应力诱导的成骨细胞胞内 Ca^{2+} 增高至少部分通过力敏感离子通道^[71], 且牵拉使其电导增加并变得对机械刺激更为敏感^[64]. 另有报道表明, 机械应变和剪应力均可诱导胞内 IP_3 浓度增高^[37,72], 而 IP_3 可以释放胞内 Ca^{2+} 库, 使胞内 Ca^{2+} 浓度增高. 此外, 胞内 Ca^{2+} 的增高需要胞内 Ca^{2+} 库和胞外 Ca^{2+} 的同时参与^[69].

cAMP 也是骨骼细胞中力转导过程的重要第二信使分子. 自从 Rodan 等人^[73] 报道 cAMP 在骨骼重建过程中的可能作用以来, 先后有人报道机械牵拉和剪应力均可使胞内 cAMP 浓度增高^[34,39]. 胞内 cAMP 浓度的增高与力刺激诱导的细胞增殖和基质合成密切相关^[74]. Reich 等人证明, cAMP 与流动电位无关, 其合成依赖于前列腺素的合成, 环氧化酶 (COX, 前列腺素生物合成过程中的关键酶) 抑制剂可阻断剪应力诱导的 cAMP 浓度增高现象^[34].

cAMP 的合成由位于细胞膜上的腺苷酸环化酶 (AC) 催化. 有证据表明, AC 信号通路参与力转化过程^[75], 但似乎并非上游的起始信号. Jones 和 Scholubbers 最早提出, 磷脂酰肌醇参与力转导过程^[76]. 磷脂酰肌醇信号通路是一个双信号通路. 位于细胞膜上的磷脂酶 C (PLC) 水解膜上的 4, 5-二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP_2) 生成 IP_3 和二酰基甘油 (DG). IP_3 可动员胞内钙库的释放, 而 DG 可激活蛋白激酶 C (PKC). 机械刺激可在 20 s 内增高 IP_3 水平, 并使 IP_3 水平和 PKC 活性在 2 min 内达到峰值^[76]. Carvalho 等人^[77] 和 Jones 等人^[68] 也证明机械牵拉可使 PKC 活性增高. 此外, 磷脂酶 A_2 (PLA_2) 可能也参与力的转导过程. 据报道, 应变可直接激活 PLA_2 ^[78].

4.3 基因表达变化

目前已见报道的载荷诱导的基因表达变化可分为 4 类: (1) 立即早期基因; (2) 胞外基质

分子; (3) 细胞因子; (4) 酶. 下面分别加以介绍.

4.3.1 立即早期基因表达的变化

Raab-Cullen 等人报道, 机械刺激可使大鼠骨外膜细胞 c-fos 表达上调^[79]. 随后的实验证据表明, 骨细胞在机械应变作用下 c-fos 表达同样出现增高趋势^[80]. c-fos 是一种立即早期基因, c-fos/c-jun 异源二聚体即为转录因子 AP-1, 可结合于基因调控序列中的 AP-1 结合位点从而启动相关的基因表达. AP-1 与其结合位点的相互作用可能受到 PKC 的调节, 这种调节是通过 PKC 对 c-jun 的磷酸化实现的.

4.3.2 胞外基质分子基因表达的变化

载荷诱导的骨生成不可避免地涉及到新生骨基质的形成. 机械应变或剪应力诱导的成骨细胞胞外基质分子合成活性的变化均有报道. Jones 等人报道, 机械应变可使 I 型胶原合成增加, 这种反应可为 PKC 抑制剂 H7 阻断^[68]. Owan 等人报道, 剪应力可使骨桥蛋白 (osteopontin) 表达上调^[35]. 此外, 骨组织特有的胞外基质蛋白骨钙素的表达同样可为机械应变作用上调^[41]. I 型胶原是骨基质中的主要蛋白成分, 是骨抗拉伸强度的主要因素. 骨钙素则与骨基质中钙的沉积密切相关. 有趣的是, 作为一种与羟基磷灰石紧密结合的蛋白, 骨桥蛋白可为破骨细胞细胞膜上的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 识别, 并调节破骨细胞的功能. 与其他的整合素及配体相互作用相似, 骨桥蛋白与 $\alpha_v\beta_3$ 的结合也是通过 RGD (Arg-Gly-Asp) 序列介导的.

4.3.3 细胞因子表达变化

目前已见报道机械载荷导致的表达发生变化的细胞因子有胰岛素样生长因子 -1 (IGF-1)^[81] 和转化生长因子 - β (TGF- β)^[82]. 其中, 前者表达上调, 后者表达下调. IGF-1 是骨骼细胞所分泌的丰度最高的细胞因子之一, 可诱导成骨细胞增殖分化, 并被证明在在体情况下能够诱导骨生成. 至于 TGF- β , 是一类多肽的统称. 在骨组织中有很高的含量. 体外实验表明, TGF- β 可以调节破骨细胞的增殖、趋化运动和激活过程, 不同条件下既可抑制又可促进骨生成, 因此对骨骼质量的维持或增加有重要作用. Klein-Nulend 等人的工作表明, 前列腺素可使成骨细胞 TGF- β 表达下调, 前列腺素合成的抑制剂可抑制剪应力引起的 TGF- β 表达下调^[82].

4.3.4 酶基因表达变化

当前最为关注的表达发生变化的酶主要是两个, 即 NO 合酶 (NOS) 和 COX. 因为这两种酶与胞间信号分子密切相关, 所以放在下面胞间信号分子的生成中加以介绍.

5 胞间信号转导 (Cell-to-cell communication)

此处所说的胞间信号转导, 是指由骨细胞到成骨细胞或破骨细胞的信号转导, 包括胞间信号分子的生成和对靶细胞的作用, 在此一并介绍. 需要指出的是, 这种说法是基于 Duncan 和 Turner 等提出的假说^[13,56], 即在载荷诱导的骨生长过程中, 骨细胞是一种感受细胞或曰传感细胞 (sensor). 骨细胞可感受载荷产生的微观力学环境并释放信号分子作用于效应细胞 (effector) 即成骨细胞和 / 或破骨细胞, 从而导致相应的骨生成或骨吸收. 根据生理学的定义, 这种方式的胞间信号转导是一种旁分泌效应. 然而, 成骨细胞在载荷作用下同样可以产生骨细胞所分泌的旁分泌因子, 并以自分泌的方式作用于自身.

根据 Duncan 和 Turner 的观点, 最重要的旁分泌因子有 NO, PGE₂ 和 IGF-1 三种, 下面分别加以介绍.

(1) 一氧化氮 (NO)

NO 是一种重要的信号分子, 可参与血管调节、神经传递、炎症和免疫反应等许多重要生理和病理过程. 在哺乳动物中, NO 的作用几乎涉及所有的脏器. NO 由 NOS (一氧化氮合酶) 以 L-精氨酸为底物催化合成. 在生化表型上, 一氧化氮合酶可分为两种, 即组成型 (cNOS) 和诱导型 (iNOS). 细胞无须加以诱导即可合成 cNOS, 并以非活性形式储存在细胞中. 胞内 Ca²⁺ 浓度的增高可迅速短暂地激活 cNOS. cNOS 包括脑型 (nNOS) 和内皮型 (eNOS) 两种, 最早分别发现于神经系统和血管内皮细胞中. nNOS 和 eNOS 是不同编码基因的产物, 其亚细胞水平的

分布也不同, nNOS 均匀地分布在细胞质中, 而 eNOS 主要存在于细胞抽提物的颗粒成分中, 表明其与膜性成分结合的可能. iNOS 与 cNOS 性质迥异, 其合成需要诱导因子的存在. 细胞在诱导后数小时才能生成 iNOS, 然而一旦生成, 相对于 cNOS, 其活性可维持较长时间.

成骨细胞已被证明可合成 NO, 包括大鼠成骨肉瘤细胞 UMR-106 和原代培养成骨细胞样细胞^[83]、小鼠成骨肉瘤细胞 MC3T3-E1^[84] 和人原代培养成骨细胞样细胞^[85]. 1995 年 Pitsillides 等人首次报道载荷可以诱导 NO 水平的变化^[86]. 他们的工作表明, 大鼠成骨细胞和鸡骨细胞在机械应变作用下, NO 合成在数分钟内即可表现出增高现象, 并利用 RT-PCT 技术证明, 这些细胞即可表达 iNOS 也可表达 cNOS, 从而表明 NO 在载荷诱导骨生长的过程中可能起到信号转导的作用. 此后, 研究人员证明剪应力也可诱导成骨细胞和骨细胞合成 NO^[87]. 动物实验表明, NO 确实在载荷诱导骨生成过程中起重要作用, NOS 抑制剂可抑制该过程. Klein-Nulend 等人的工作还表明, 剪应力诱导的 NO 合成是剪应力诱导的 PGE₂ 合成的必要条件^[87].

NO 介导的效应常常涉及到靶细胞鸟苷酸环化酶活性的提高和环鸟苷酸 (cGMP) 的形成. 利用组织化学的方法, Fukushima 和 Gay^[88] 证明, 鸡成骨细胞可合成 cGMP, 而骨细胞和破骨细胞不能. 这在一定程度上支持了 Duncan 和 Turner 提出的 NO 是一种旁分泌因子的观点^[13,56].

(2) 前列腺素

前列腺素最早见于腔肠动物, 且广泛存在于人体的多种组织. 前列腺素不仅在炎症过程中有重要作用, 还可调节机体其他重要的生理功能和病理过程, 如神经系统、肾脏和生殖系统的功能. 与激素 (体内有特定的合成部位, 作用于全身) 不同的是, 前列腺素在多种组织内均可合成, 并以自分泌或旁分泌的方式发挥作用. 细胞内存在两类前列腺素受体: 一类是位于细胞膜上的 G-蛋白耦联受体 (如 PGE₂ 受体 EP₁₋₄); 一类是位于细胞核中的受体 PPAR. 核受体结合前列腺素后, 可直接作为转录因子起作用.

前列腺素的生物合成是以花生四烯酸等二十碳不饱和脂肪酸为底物, 经过中间 5 个碳原子的环氧化形成的. 这个过程中关键的调节酶是环氧化酶 (COX), 又称 PGH 合成酶. 该酶催化花生四烯酸等二十碳不饱和脂肪酸的环氧化从而生成 PGG₂ 和 PGH₂. PGH₂ 随后可转化成 PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ 和凝血烷等.

目前已知的 COX 有两种, 即 COX1 和 COX2, 分别由不同的基因合成. 两种 COX 催化功能基本上相同, 并有类似的一级结构. 然而, 其生理意义有所不同. COX1 主要与机体的正常生理功能有关, 而炎症及其他的可诱导 COX 效应主要由 COX2 负责.

已有广泛的文献报道证明, 机械应变或剪应力可诱导成骨细胞^[37,38,89,90] 和骨细胞^[49,91] PGE₂ 合成的增高. 此外, 载荷还可诱导骨外植体 PGE₂ 和前列腺环素合成增多^[92]. 载荷诱导的前列腺素合成是由 COX2 介导的, NS-398 (COX2 特异性抑制剂) 可完全阻断载荷诱导的骨生成, 而 indomethacin (COX 非特异抑制剂) 仅有部分抑制效应. 动物实验也证实, 前列腺素介导了载荷诱导的骨生成, 而前列腺环素可引起骨细胞类似于受载时的早期代谢反应. 据报道, 剪应力诱导的 PGE₂ 合成受到多个信号途径的调控, 包括 PKC^[38], G 蛋白^[89] 和细胞骨架^[91]. 表明该过程受到复杂的调控.

PGE₂ 参与骨骼的代谢作用, 可刺激成骨细胞增殖、增强碱性磷酸酶活性和促进胶原合成. 此外, PGE₂ 还有一个非常重要的功能, 即募集成骨细胞前体细胞. 实验表明, PGE₂ 可促进成骨细胞前体细胞的增殖^[93] 和粘附^[94]. 所以, PGE₂ 不仅可以刺激已有的成骨细胞的骨生成能力, 还可以通过成骨细胞前体的募集和分化来增加成骨细胞的数量.

(3) 胰岛素样生长因子-1(IGF-1)

IGF-1 是骨骼细胞分泌的丰度最高的细胞因子之一. IGF-1 可刺激大鼠成骨细胞骨基质合成及细胞增殖速度, 并可促进骨骼的在体合成. 甲状腺素 (PTH) 对骨骼代谢的调节作用可能也是通过 IGF 类生长因子实现的. Lean 等人报道^[95], 骨细胞加载后 6 小时 IGF-1 表达上调, 而成骨细胞 I 型胶原和骨钙素的表达在 48 小时后才呈现增高趋势, 从而为力信号的旁分泌转导机制提供了有利的支持.

6 效应细胞的反应 (Effector response)

所谓效应细胞,是指成骨细胞和破骨细胞.这两种细胞是最终决定骨平衡态趋势的执行人.效应细胞反应可以从细胞水平和组织水平两个不同的角度加以考察.细胞水平的反应如上所述,包括成骨细胞胞外基质分子分泌的变化和碱性磷酸酶水平的变化等.至于破骨细胞的反应,目前尚无直接的证据.考虑到破骨细胞与成骨细胞间密切的相互作用,成骨细胞在载荷作用下活性的变化有可能导致破骨细胞活性状态的相应改变.

组织水平的变化则反应在骨质量的增加或减少上.通过过去 20 余年的研究,目前有这样几个明显的规律: 1) 只有动态载荷才能有效地诱导骨生成^[10,20]; 2) 只有强度超过某一阈值时,载荷才能诱导代谢反应^[12,96]; 3) 不论采取哪种加载方式和动物模型,骨代谢反应的变化都有 3~5 天的延迟时间^[46,48]; 4) 年龄的增长会大大降低骨骼对载荷的响应能力^[97,98].

7 结 语

力的转导 (mechanotransduction) 在许多组织 (如血管、心脏和骨骼等) 的生理功能中有着重要的作用.对局部物理刺激的响应和顺应可使机体更好地生活于重力场中.伽利略早在 1638 年就注意到了重力在骨骼的大小和形状中的决定性作用.此后,机械力对骨骼的个体发育和系统发生的影响被广泛地加以研究. Wolff 定律的提出可以说是一个重要的里程碑.在历史上首次给出了物理力与机体组织 (骨骼) 之间的定量的数学对应关系^[1]. Wolff 提出了一个非常重要的问题: 什么样的微观机制使得骨骼这样适于使用?

今天,我们也许要为 Wolff 的问题换一个提法: 什么样的微观机制介导了骨骼对载荷的顺应反应? Frost 的 Mechanostat 理论为骨的顺应提供了一个宏观的解释.当应变超过一定水平时,可导致新生骨基质的形成.而当应变小于一定水平时,则发生骨吸收.激素可在一定程度上欺骗 Mechanostat 机制,从而允许较低水平应变条件下骨骼质量的显著增加. Turner 和 Duncan 等人提出的假说为数量繁多的文献提供了概念框架,从细胞水平对 Wolff 定律进行了一定的阐述.他们认为,载荷诱导骨生长的过程可分为四个环节,即力学耦联、生物化学耦联、胞间信号转导和效应细胞反应.具体来说,载荷可在骨骼局部产生剪应力,骨细胞可感受剪应力并对剪应力作出反应,生成 NO、PGE₂ 和 IGF-1 等信号分子,从而募集成骨细胞前体细胞并促进其分化,且可诱导成骨细胞分泌胞外基质分子.

然而,很遗憾,今天我们对 Wolff 问题的许多细节还不甚了解,这表现以下几个方面.

(1) 新生胞外基质分子的组织方式

组织水平上的研究表明,载荷可诱导胞外基质分子 (胶原、骨钙素、骨桥蛋白等) 分泌的变化.胶原纤维和蛋白聚糖分别可增强骨抗拉伸强度和抗压强度,其组织方式与骨的力学性质密切相关.然而,现在所有的报道都仅仅涉及这些物质数量的变化,而对新生骨基质组织方式的研究则是一片空白. Wolff 定律实际上包括两个方面,一是骨质量的变化; 一是骨结构的变化.所以,组织水平的研究还有待深化.

(2) 信号转导的具体途径

虽然已知 Ca²⁺、PKC、cAMP 和 IP₃ 等第二信使系统可在应力作用下发生变化,然而关于最初的力感受机制及力感受元件几乎仍一无所知.细胞骨架、力敏感离子通道和 G 蛋白耦联受体是目前认为的几种可能的感受机制.张力整体模型认为,细胞骨架可将力迅速地转导到细胞的各个部分,然而力究竟怎样通过细胞骨架转化为生物学信号仍不得而知.至于力敏感离子通道,其开关机制如何,目前也知之甚少.而对 G 蛋白耦联的受体了解更少,只是借用了传统细胞生物学中的概念,至于其化学本质全然是一片空白.此外,第二信使分子下游的信号转导机制尚未见报道.所以第二信使究竟如何进一步转导信号仍有待研究.

(3) 基因表达变化的机制

基因的表达受到严格的调控机制的制约.虽然已知机械应变或剪应力可诱导骨骼细胞基因

表达的变化,但其机制如何尚不得而知.基因表达的调控包括两个因素,即顺式作用元件(基因编码序列上游或下游的调控序列)和逆式作用元件(与顺式作用元件相结合的因子如转录因子).血管内皮细胞的研究也许可对骨骼细胞基因表达的调控机制提供一些借鉴. Resnick 等人最早报道血小板衍生生长因子(PDGF) B链的操纵子含有顺式作用的剪应力应答元件(SSRE)^[99].目前内皮细胞中被认为可对剪应力进行响应的SSRE及相应的结合因子和基因见表1.这些SSRE在骨细胞和成骨细胞中是否存在以及在载荷诱导的骨细胞和成骨细胞基因表达变化过程中是否具有和血管内皮细胞中相似的作用还有待确定.

表1 剪应力应答元件、相应的结合因子和基因^[100]

SSRE	Binding factor	Relative genes
GAGACC	SSRE-BP	NOS, PDGF-B, TGF- β , t-PA MCP-1, ICAM-1, c-fos, c-jun
TGACTCC	AP-1	ET-1, PDGF-A, PDGF-B, TGF- β
TCACTCA		t-PA, MCP-1, ICAM-1
GGAAGATCCCT	NF κ B	VCAM-1

SSRE: 剪应力应答元件, SSRE-BP: 剪应力应答元件结合蛋白, NOS: 一氧化氮合酶, PDGF-B: 血小板衍生生长因子 -B, TGF- β : 转化生长因子 - β , t-PA: 组织型纤溶酶原激活因子, MCP-1: 单核细胞趋化蛋白 -1, ICAM-1: 胞间粘附分子 -1, ET-1: 内皮素 -1, PDGF-A: 血小板衍生生长因子 -A, VCAM-1: 血管细胞粘附分子 -1

(4) 骨骼细胞对力信号的筛选机制

骨骼的结构与其在日常生活中所经受的主要载荷水平相对应.正如 Wolff 定律中所描述的,骨小梁的排列方式与主应力轨迹间存在确切的对应关系.这里隐含着这样一个问题,即为什么骨骼已经习惯的载荷条件不再引起骨的顺应反应?某种信号筛选机制是必然存在的,这种机制可能发生在不同的水平上.在组织水平上,如 Mechanostat 理论所描述的,骨的塑建或重建分别可减少或增加骨局部的应变,使其处于生理范围内,由此改变载荷作用下局部的微观力学环境,使得骨骼细胞不被激活.但是,仅仅如此还不能彻底解释骨骼细胞对力信号的筛选现象.因为即使是生理范围内的载荷也足以在骨小管内产生电位的变化和剪切力,所以细胞水平的信号筛选机制是必要的.细胞骨架的重排也许可为这个问题提供一些线索.应力的作用常常伴随有细胞骨架的重排,而这必然会改变细胞本身的力学性质,从而改变其对应力的响应.由此可见,必须有定量的细胞力学描述才能透彻理解细胞对力刺激的反应,这也涉及到应力与细胞关系的另一个方面,即细胞的内应力对细胞结构和功能的影响.

总之,应力与细胞和组织的结构、功能及其生理学之间的关系正日渐引起人们的关注,并逐渐形成一个新兴的学科——力学细胞生物学.研究证实,骨骼细胞、上皮细胞、血管内皮细胞、心肌细胞、软骨细胞等均可对应力刺激作出应答.了解其机制有助于认识重力环境中细胞和组织的生长和分化的调控机制,具有重要的生理意义.此外,对一些临床常见的疾病如骨折的治疗和康复也有重要的意义^[101,102],因此具有广阔的应用前景.

参 考 文 献

- 1 Wolff J. Das Gesetz der Transformation der Knochen. Kirschwald, 1892
- 2 Dibbets J M H. One century of Wolff's law. In: Carlson D S, Goldstein S A, eds. Bone Dynamics in Orthodontic and Orthopaedic Treatment. Center for Human Growth and Development, University of Michigan Press, Ann Arbor, 1992. 1~13
- 3 Wronski T J, Morey E R. Effect of spaceflight on periosteal bone formation in rats. *Am J Physiol*, 1983, 244: R305~309
- 4 Vico L, Chappard L D, Alexander C, et al. Effects of weightlessness on bone mass and osteoclast number in pregnant rats after a five-day spaceflight (COSMOS 1514). *Bone*, 1987, 8: 95~103
- 5 Patterson-Buckendahl P E, Grindeland R E, Martin R B, et al. Osteocalcin as an indicator of bone metabolism during spaceflight. *Physiologist*, 1985, 28(suppl): S227~S228
- 6 Donaldson C L, Hulley S B, Vogel J M, et al. Effects of prolonged bed rest on bone mineral. *Metabolism*, 1970,

- 7 Vico L, Chappard L D, Alexander C, et al. Effects of a 120-day period of bed rest on bone mass and bone cell activities in man: attempts at countermeasure. *Bone Miner*, 1987, 2: 383~394
- 8 Bassey E J, Ramsdale S J. Increase in femoral bone density in young women following high-impact exercise. *Osteoporosis Int*, 1994, 4: 72~75
- 9 Simkin A, Ayalon J, Leichter I. Increased trabecular bone density due to bone-loading exercises in menopausal osteoporotic women. *Calcif Tiss Int*, 1987, 40: 59~63
- 10 Turner C H, Forwood M R, Otter M W. Mechanotransduction in bone: do bone cells act as sensors of fluid flow. *FASEB J*, 1994, 8: 875~878
- 11 Turner C H, Owan I, Yuichi Takano. Mechanotransduction in bone: the role of strain rate. *Am J Physiol*, 1995, 269: E438~442
- 12 Turner C H, Forwood M R, Rho J, et al. Mechanical loading thresholds for lamellar and woven bone formation. *J Bone Miner Res*, 1994, 9: 87~97
- 13 Duncan R L, Turner C H. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tiss Int*, 1995, 57: 344~358
- 14 Frost H M. Bone "mass" and the "mechnostat": a proposal. *Anat Rec*, 1987, 219: 1~9
- 15 Lanyon L E, Hampson W G J, Goodship A E, et al. Bone deformation recorded in vivo from strain gauges attached to human tibial shaft. *Acta Orthop Scand*, 1975, 46: 256~268
- 16 Burr D B, Milgrom C, Fyhrie D, et al. Human in vivo tibial strains during vigorous activities (abstract). *Trans Orthop Res Soc*, 1995, 20: 202
- 17 Rubin C T, Lanyon L E. Limb mechanics as a function of speed and gait: a study of functional strains in the radius and tibia of horse and dog. *J Exp Biol*, 1982, 101: 187~211
- 18 Bertram J E A, Biewener A A. Bone curvature: sacrificing strength for load predictability? *J Theor Biol*, 1988, 131: 75~92
- 19 Rubin C T, Lanyon L E. Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. *Calcif Tiss Int*, 1985, 37: 411~417
- 20 Lanyon L E, Rubin C T. Static versus dynamic loads as influence on bone remodeling. *J Biomechanics*, 1984, 17: 897~906
- 21 Rubin C T, Lanyon L E. Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J Bone Joint Surg*, 1984, 66A: 397~402
- 22 Burr D B, Martin R B, Schaffler M B, et al. Bone remodeling in response to in vivo fatigue microdamage. *J Biomech*, 1985, 18: 189~200
- 23 Caler W E, Carter D R. Bone creep fatigue damage accumulation. *J Biomech*, 1989, 22: 625~635
- 24 Frost H M. *Bone Dynamics in Osteoporosis and Osteomalacia*. Springfield, IL: Thomas, 1966
- 25 Martin R B, Burr D B. A hypothetical mechanism for the stimulation of osteonal remodeling by fatigue damage. *J Biomech*, 1982, 15: 137~139
- 26 Fukada E, Yasuda I. On piezoelectric effect of bone. *J Phys Soc*, 1957, 12: 1158
- 27 Becker R O, Murray D G. The electrical control system regulating fracture healing in amphibians. *Clinical Orthopedics*, 1970, 73: 169~198
- 28 Gross D, Williams W S. Streaming potential and the electromechanical response of physiological-moist bone. *J Biomech*, 1982, 15: 277~295
- 29 Weinbaum S, Cowin S C, Zeng Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stress. *J Biomech*, 1994, 27: 339~360
- 30 Chakkalakal D A. Mechanoelectric transduction in bone. *J Mater Res*, 1989, 4: 1034~1046
- 31 McLeod K J, Rubin C T. The effect of low frequency electrical fields on osteogenesis. *J Bone Joint Surg*, 1992, 74A: 920~929
- 32 Roer R D, Dillaman R M. Bone growth and calcium balance during simulated weightlessness in the rat. *J Appl Physiol*, 1990, 68: 13~20
- 33 Dillaman R M, Roer R D, Gay D M. Fluid movement in bone: theoretical and empirical. *J Biomech*, 1991, 24(suppl 1): 163~177
- 34 Reich K M, Gay C V, Frangos J A. Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production. *J Cell Physiol*, 1990, 143: 100~104
- 35 Owan Ichiro, Burr D B, Turner C H, et al. Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *Am J Physiol*, 1997, 273: C810~C815
- 36 Otter M W, Palmieri V R, Wu D D, et al. A comparative analysis of streaming potentials in vivo and in vitro. *J Orthop Res*, 1992, 10: 710~719

- 37 Reich K M, Gay C V, Frangos J A. Effect of flow on prostaglandin E₂ and inositol phosphate levels in osteoblast. *Am J Physiol*, 1990, 261: C428~C432
- 38 Reich K M, Gay C V, Frangos J A. Protein kinase C mediates flow induced prostaglandin E₂ production in osteoblast. *Calcif Tiss Int*, 1993, 52: 62~66
- 39 Sandy J R, Meghji S, Farndale R W, et al. Dual elevation of cyclic AMP and inositol phosphates in response to mechanical deformation of murine osteoblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 1010: 265~269
- 40 Buckley M J, Banes A J, Levin L G, et al. Osteoblasts increase their rate of division and align in response to cyclic mechanical tension. *Bone Miner*, 1988, 4: 225~236
- 41 Harter L V, Hruska K A, Duncan R L. Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation. *Endocrinology*, 1995, 136: 528~535
- 42 Murray DW, Rushton N. The effect of strain on bone cell prostaglandin E₂ release: a new experimental method. *Calcif Tissue Int*, 1990, 47: 35~39
- 43 Yeh C, Rodan G A. Tensile forces enhance prostaglandin E synthesis in osteoblasts grown on collagen ribbon. *Calcif Tissue Int*, 1984, 36(suppl 1): S67~S71
- 44 Parfitt A M. The physiological and clinical significance of bone histomorphometric data. In: Recker R R, ed. *Bone Histomorphometry*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1983. 143~223
- 45 Frost H M. Measurement of osteocytes per unit volume and volume components of osteocytes and canaliculae in man. *Henry Ford Hosp Med Bull*, 1960, 8: 208
- 46 Pead M J, Suswillo R, Skerry T M, et al. Increased ³H urine levels in osteocytes following a single short period of dynamic bone loading in vivo. *Calcif Tiss Int*, 1988, 43: 92~96
- 47 Skerry T M, Bitensky L, Chayen J, et al. Early-strain related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo. *J Bone Miner Res*, 1989, 4: 783~788
- 48 Dodds R A, Ali N, Pead M J, et al. Early-loading related changes in the activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase and alkaline phosphatase in osteocytes and periosteal osteoblasts in rat femur in vivo. *J Bone Miner Res*, 1993, 8: 261~267
- 49 Klein-Nulend J, van der Plas A, Semlin CM, et al. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB J*, 1995, 9: 441~445
- 50 Sims J R, Karp S, Ingber D E. Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape. *J Cell Sci*, 1992, 103: 1215~1222
- 51 Ingber D E, Karp S, Plopper G, et al. Mechanochemical transduction across extracellular matrix and through the cytoskeleton. In: Frangos J A, ed. *Physical Forces and the Mammalian Cell*. New York: Academic Press, 1993. 61~79
- 52 Ingber D E. Cellular tensegrity: Defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J Cell Sci*, 1993, 104: 613~627
- 53 Ingber D E, Folkman J. Mechanochemical switching between growth and differentiations during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *J Cell Sci*, 1989, 109: 317~330
- 54 Syda T, Takahashi N, Martin T J. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine Rev*, 1992, 13: 66~80
- 55 Tenenbaum H C. Cellular origins and theories of differentiation of bone forming cells. In: Hall K, ed. *Bone*, Vol 1: The Osteoblast and Osteocyte. Caldwell N J: Telford Press, 1992. 41~69
- 56 Turner C H, Pavalko F M. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: The mechanism and mechanics of bone adaptation. *J Ortop Sci*, 1998, 3: 346~355
- 57 Pavalko F M, Burridge K. Disruption of the actin cytoskeleton after microinjection of proteolytic fragments of alpha-actinin. *J Cell Biol*, 1991, 114: 481~491
- 58 Bidweel J P, van Wijmen A J, Fey E G, et al. Osteocalcin gene promoter-binding factors are tissue-specific nuclear matrix components. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 3162~3166
- 59 Merriman H L, van Wijmen A J, Hiebert S, et al. The tissue specific nuclear matrix protein, NMP-2, is a member of the AML/CBF/PEBP2/Runt Domain transcription factor family: interactions with the osteocalcin gene promoter. *Biochemistry*, 1995, 34: 13125~13132
- 60 Guharay F, Sachs F. Stretch-activated single ion channel current in tissue cultured embryonic chick skeletal muscle. *J Physiol*, 1984, 352: 685~701
- 61 Sachs F. Mechanical transduction in biological system. *Crit Rev Biomed Eng*, 1988, 16: 141~169
- 62 Duncan R L, Misler S. Voltage-activated and stretch-activated Ba²⁺ conducting channel in an osteoblast-like cell line (UMR 106). *FEBS Lett*, 1989, 251: 17~21
- 63 Davidson R M, Tatakis D W, Auerbach A L. Multiple forms of mechanosensitive ion channels in osteoblast-like cells. *Pflugers Arch*, 1990, 416: 646~651
- 64 Duncan R L, Hruska K A. Chronic, intermittent loading alters mechanosensitive channel characteristics in osteoblast-like cells. *Am J Physiol*, 1994, 267: F909~F916

- 65 Duncan R L, Harter L V, Levin D W, et al. Regulation of stretch-activated cation channel activity via the cytoskeleton and similar to hormonal regulation (abstract). *Mol Biol Cell*, 1992, 3: 38a
- 66 Olesen S-P, Clapham D E, Davies P F. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature*, 1988, 331: 168~170
- 67 Ypey D L, Ravesslot J H, Buisman H P, et al. Voltage-activated ion channels and conductance in embryonic chick osteoblast cultures. *J Membrane Biol*, 1988, 101: 141~150
- 68 Jones D B, Nolte H, Scholubbers J-G, et al. Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials*, 1991, 12: 101~110
- 69 Hung C T, Allen F D, Pollack S R, et al. Intracellular Ca²⁺ stores and extracellular Ca²⁺ are required in the real-time Ca²⁺ response of bone cells experiencing fluid flow. *J Biomech*, 1996, 29: 1411~1417
- 70 Goligosky M S. Mechanical stimulation induces Ca²⁺ transients and membrane depolarization in cultured endothelial cells. Effects on Ca²⁺ in co-perfused smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 1998, 240: 59~64
- 71 Duncan R L, Kizer N, Barry E L, et al. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of a swelling-activated cation channel in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 1864~1869
- 72 Sandy J R, Meghji S, Farndale R W, et al. Dual elevation of cyclic AMP and inositol phosphates in response to mechanical deformation of murine osteoblasts. *Biochem Biophys Acta*, 1989, 1010: 265~269
- 73 Rodan G A, Bourret L A, Harvey A, et al. Cyclic AMP and cyclic GMP: mediators of the mechanical effects on bone remodeling. *Science*, 1975, 189: 467~469
- 74 Copray J C V M, Jansen H W B, Duterloo H S, et al. Effects of compressive forces on proliferation and matrix synthesis in mandibular condyle cartilage of the rat in vitro. *Arch Oral Biol*, 1985, 30: 299~317
- 75 Davidovitch Z, Shanfeld J, Montgomery E, et al. Biochemical mediators of the effect of mechanical forces and electric currents in mineralized tissues. *Calcif Tiss Int*, 1984, 36: S86~S97
- 76 Jones D B, Scholubbers J G. Evidence that phospholipase C mediates the mechanical strain response in bone. *Calcif Tiss Int*, 1987, 41: 4~10
- 77 Carvalho R S, Scott J E, Suga D M et al. Stimulation of signal transduction pathway in osteoblast by mechanical strain potentiated by parathyroid hormone. *J Bone Miner Res*, 1994, 9: 999~1011
- 78 Binderman I, Zor U, Kaye A, et al. The transduction of mechanical force into biochemical events in bone cells may involve activation of phospholipase A₂. *Calcif Tiss Int*, 1988, 42: 261~266
- 79 Raab-Cullen D M, Thiede M A, Peterson D N, et al. Mechanical loading stimulates rapid changes in periosteal gene expression. *Calcif Tiss Int*, 1994, 55: 473~478
- 80 Inaoka T, Lean J M, Bessho T, et al. Sequential analysis of gene expression after an osteogenic stimulus: c-fos expression is induced in osteocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 217: 264~270
- 81 Lean J M, Jagger C T, Chambers T J, et al. Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation. *Am J Physiol*, 1995, 268: E318~E327
- 82 Klein-Nulend J, Semeins C M, Burger E H. Prostaglandin mediated modulation of transforming growth factor- β metabolism in primary mouse osteoblastic cells in vitro. *J Cell Physiol*, 1996, 168: 1~7
- 83 Lowik C W G M, Nibbering P H, van de Ruit M, et al. Inducible production of nitric oxide in osteoblast in osteoblast-like cells and in fetal mouse bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption. *J Clin Invest*, 1994, 93: 1465~1472
- 84 Damoulis P D, Hauschka P V. Cytokins induce nitric oxide production in mouse osteoblast. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 201: 924~931
- 85 Ralston S H, Todd D, Helfrich M, et al. Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and inducible nitric oxide synthase. *Endocrinology*, 1994, 135: 330~336
- 86 Pitsillides A A, Rawlinson S C F, Suswillo R F L, et al. Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modeling? *FASEB J*, 1995, 9: 1614~1622
- 87 Klein-Nulend J, Semeins C M, Ajubi N E, et al. Pulsatile fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteoblasts but not periosteal fibroblasts—correlation with prostaglandin upregulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 217: 640~648
- 88 Fukushima O, Gay C V. Ultrastructural localisation of guanylate cyclase in bone cells. *J Histochem Cytochem*, 1991, 39: 529~535
- 89 Reich K M, Mcallister T N, Gudi S. Activation of G protein mediates flow-induced prostaglandin E₂ production in osteoblast. *Endocrinology*, 1997, 138: 1014~1018
- 90 Klein-Nulend J, Burger E H, Semeins C M, et al. Pulsatile fluid flow stimulates prostaglandin G/H synthase mRNA expression in primary mouse bone cells. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 45~51
- 91 Ajubi N E, Klein-Nulend J, Nijweide P J, et al. Pulsatile fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes—A cytoskeleton-dependent process. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 225: 62~68

- 92 Rawlinson S C F, El-Haj A J, Minter S L, et al. Loading-related increases in prostaglandin production in cores of adult canine cancellous bone in vitro: a role for prostacyclin in adaptive bone remodeling? *J Bone Miner Res*, 1991, 6: 1345~1351
- 93 Gronowicz G A, Fall P M, Raisz L G. Prostaglandin E₂ stimulates preosteoblast replication: an autoradiographic study in cultured fetal rat calvariae. *Exp Cell Res*, 1994, 212: 314~320
- 94 Scutt A, Bertram P. Bone marrow cells are targets for anabolic actions of prostaglandin E₂ on bone: induction of a transition nonadherent to adherent osteoblast precursors. *J Bone Miner Res*, 1995, 10: 474~487
- 95 Lean J M, Jagger C J, Chambers T J, et al. Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation. *Am J Physiol*, 1995, 268: E318~E327
- 96 Chow J W M, Jagger C J, Chambers T J. Characterization of osteogenic response to mechanical stimulation in cancellous bone of rat caudal vertebrae. *Am J Physiol*, 1993, 265: E340~E347
- 97 Rubin C T, Bain S D, McLeod K J. Suppression of the osteogenic response in the aging skeleton. *Calcif Tissue Int*, 1992, 50: 306~313
- 98 Turner C H, Takano Y, Owan I. Aging changes mechanical loading thresholds for bone formation in rats. *J Bone Miner Res*, 1995, 10: 1544~1549
- 99 Resnick N, Collins T, Atkinson W, et al. Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 4591~4595
- 100 Malek A M, Izumo S. Control of endothelial cells gene expression by fluid flow. *J Biomech*, 1995, 28: 1515~1528
- 101 柴本甫. 应力对骨及骨折愈合的影响. *生物力学*, 1986, 1(1): 53~57
- 102 钱民全等. 骨折骨的生长和愈合方程. 见: 第三届全国生物固体力学讨论会论文集. 1990年7月. 歙县

THE MECHANOCYTOBIOLOGICAL MECHANISMS OF LOADING-INDUCED BONE FORMATION

Zhang Yiyi Tao Zulai

Institute of Mechanics, CAS, Beijing 100080, China

Abstract The structure and the function of bones are dependent to a large extent on its mechanical environment, and this point of view has been widely accepted. Since Wolff presented his famous Law of Bone Transformation, the relationship between the bone formation and the mechanical loading has become an important question of biomechanics. Numerous animal experiments demonstrated a clear linkage between them. However, the mechanocytobiological mechanisms were poorly understood. The loading studies on in vitro cultured bone cells of this decade have provided a microscopic theoretical framework for this question. It is believed today that the process of loading-induced bone formation can be divided into four steps, namely: mechanocoupling, biochemical coupling, cell-to-cell signal transduction and effector responses. These steps are described in detail in this paper and the directions of future studies are discussed.

Keywords mechanocytobiology, stress and growth, bone cells, signal transduction