

· 综述 ·

骨组织的力负荷感受反应机制研究进展

谢力勤 崔伟 刘成林

对力学刺激的识别和反应是生物体的重要功能。触觉、听觉、压力感受器、本体感受器及重力感受功能都与力学信号的感受、传递机制有关。体内组织的形成、发展方式与其所受的应力有关,例如骨组织的结构与其内部应力分布有关,应力大的部位骨组织密度大,应力小的部位骨密度小^[1]。骨组织能用最少的骨量来满足运动功能所需的骨强度。当因衰老或力负荷减少使骨量下降时,应力小的部位骨量丢失常常较快,应力大的部位骨量保存常常较好。可见骨组织能根据外界负荷和内部应力来调节整体骨量的增减和内部骨量的分布及构造。但骨组织对力负荷的感受、传递和反应机制还不十分清楚,这也正是骨代谢研究中的重点课题。本文根据目前的研究进展和有关学说,试图对骨组织的力负荷感受机制进行阐述和探讨。

1 骨细胞是骨组织的力负荷感受细胞

骨表面有骨衬细胞(bone-lining cell)、成骨细胞和破骨细胞,其中骨衬细胞占94%,成骨细胞占5%。埋于基质中的低活性成骨细胞称为骨细胞(osteocyte)。骨衬细胞与骨细胞极相似,也是由成骨细胞活性下降转化而成,但位于骨的表面。骨衬细胞为扁平细胞,细胞器较少,蛋白合成和能量代谢较慢。骨细胞和骨衬细胞有许多突起,深入矿化基质的骨小管(canalliculi)内。细胞突起的浆膜和骨小管壁之间充满了骨组织间液和大分子蛋白聚糖。骨细胞突起长约15mm,能穿过骨小管与相邻细胞的突起相接触。每个骨细胞与多个细胞相连,最多可达

12个。两个相接触的突起构成缝隙连接,连接蛋白为connexin43^[2]。离子和小分子物质可以通过缝隙连接在细胞间传递,缝隙连接也是细胞间的电信号传递的通道。所有的骨细胞与骨内、外膜上的骨衬细胞、成骨细胞通过缝隙连接构成多极的网状结构,局部的反应信号能迅速传递到整个骨组织。

在骨骼系统中哪种细胞最有条件成为骨力学感受器呢?破骨细胞首先可排除,因其只有在骨吸收时才出现。骨衬细胞可认为是在骨表面的骨细胞。成骨细胞位于骨的表面,必须通过骨基质才能感受应力,但骨的应变很小,这需要很高的灵敏度,而且成骨细胞与矿化基质之间还存在类骨层(osteoid layer),它也不太适合于充当力学感受器。只有骨细胞最适合成为骨组织的力学感受器,首先骨细胞广泛分布,其位置适合于感受骨组织的应变,能直接感受骨应变产生的液体流动;其次骨细胞对液体流动的剪切力极为敏感。当然这并不否认成骨细胞的力负荷感受能力,因为成骨细胞是骨细胞的前身。

用脉冲液体流动和间歇液体静压力分别处理培养的骨细胞、成骨细胞、骨膜成纤维细胞,发现3种细胞的前列腺素 E_2 ($PG E_2$)的产量都升高,但骨细胞的 $PG E_2$ 升高最快^[3]。骨细胞受到脉冲液流作用1小时后,其 $PG E_2$ 产量升高可维持1小时以上,而间歇静压力需要6小时才能出现此变化。实验结果表明,骨细胞的力学感受敏感性>成骨细胞>成纤维细胞,骨细胞对流体剪切力的敏感性大于液体静压力。

采用Biot^[4]的小孔调节理论来计算,可知:生理范围内的骨力学负荷所产生液体流动的剪切力峰值为0.8~3.0Pa。经实验可知,体外培

养骨细胞能感受的流体剪切力范围是 $0.2 \sim 6.0 \text{ Pa}$ ^[4], 实验结果基本与理论计算相符合, 表明体内骨细胞能感受骨力学负荷产生的液体剪切力。

骨细胞受到液体剪切力后引起 PG 和 NO 的产量升高, 这与血管内皮细胞相类似。内皮细胞可以感受和调节血液流变力学的变化, 当血流剪切力达到 0.5 Pa 时, 内皮细胞增加 PG 和 NO 的产量, 使血管舒张, 以保持恒定的血管内剪切压力。骨细胞可能与内皮细胞相类似, 调节骨适应性重建, 使骨保持稳定的应变和稳定的骨小管内液流剪切力。

2 整合素(integrin)将细胞膜外的应力传递入细胞膜内的细胞骨架

整合素是介导细胞与细胞外基质粘附分子, 是细胞膜表面糖蛋白受体, 主要通过识别配体的“精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸”三肽序列(Arg-Gly-Asp, RGD)介导粘附。骨细胞与基质的粘合并非均匀, 细胞膜上的整合素将细胞“点焊”到胞外基质。整合素跨越细胞膜, 向外与基质的纤维连接素(FN)、骨桥蛋白(OPN)、骨唾液蛋白(BSP)相连; 向内与粘着斑相连。粘着斑由肌动蛋白(actin)、踝蛋白(talin)、桩蛋白(paxillin)、粘着斑蛋白(vinculin)和张力蛋白(tensin)组成, 将细胞骨架固定在细胞膜上^[5]。

Wang 等^[6]用 RGD 肽段包被的微小磁性铁珠黏附在内皮细胞的细胞膜上, 然后用磁场扭转磁性珠使整合素受力而不改变细胞的形态, 发现细胞骨架的内在硬度(stiff=应力/应变)随着整合素所受应力的增大而增大, 并且抑制磁珠的旋转; 用含 RGD 的可溶性多肽可抑制细胞骨架内在硬度升高的反应, 而不含 RGD 的可溶性多肽不能抑制此反应。磁珠包被整合素的抗体也能使细胞骨架产生相同的内在硬度升高的反应, 而包被非特异蛋白如牛血清蛋白则不能抑制磁珠的旋转。细胞骨架的内在硬度的升高, 需要细胞骨架 3 个组分——微丝、微管、中间纤维的结构保持完整。破坏微丝的完整

性可导致细胞骨架的内在硬度下降 85%, 破坏微管和中间纤维的完整可使内在硬度下降 25%。从以上实验结果可以得出以下结论: 整合素是细胞膜上的应力信号受体, 将应力传递给细胞骨架后引起细胞骨架的重排和内在硬度增大。

骨组织抵抗力负荷而产生应变, 骨小管和骨陷窝中的骨组织间液因压力的变化而流动。当液流经过骨细胞时, 流体的剪切力使骨细胞膜上整合素与基质蛋白的联结产生应变, 使整合素的形态发生改变, 从而激活酪氨酸激酶如粘着斑激酶(focal adhesion kinase)^[7]。粘着斑激酶通过自身磷酸化而激活, 启动桩蛋白、张力蛋白的磷酸化, 加速粘着斑的形成。随着粘着斑的形成, 流体剪切力通过细胞外基质蛋白经整合素透过细胞膜传递给细胞骨架。

3 细胞骨架的张拉完整性与骨组织的力学敏感性

整合素将应力传递给细胞骨架后, 是如何将力学信号转化为生化信号的? 要回答这个问题, 必须引入一个概念: 细胞骨架的张拉完整性。张拉完整性的概念是由 Donald E. Ingber 引入生物结构研究的^[8]。

大分子自装配成细胞器, 细胞器自装配成细胞, 细胞自装配成组织, 组织自装配成器官, 指导生物自装配的基本原则为张拉完整性(tensegrity), 能使组件的能量和质量减至最小。张拉完整性为建筑学术语, 表示一种机械上自我稳定的方式, 它能使张力和压力在结构内得以分散和平衡。张拉完整性结构分为两类, 一类为短程线圆顶(网架穹顶), 由刚性支杆构成, 每一根支杆都承受张力和压力; 另一类为预应力结构, 所有的构件都已受到张力或压力, 承受压力的刚性支杆将承载拉力的柔性构件(如: 绳索)拉直或拉紧, 同时承受拉力的柔性构件将刚性支杆压紧。张拉完整性结构有一显著特性, 张力能连续传递到所有柔性构件上, 一个柔性构件上的张力增加就会造成整个结构内所有柔性

构件的张力增加,刚性支杆抵抗张力的局部压力同时增加。张拉完整性结构的构件都定位于承受应力的最佳位置上,张力按两点间最短距离进行传递,能使整体结构达到最大强度。

细胞骨架符合张拉完整性结构,微管作为刚性支杆,抵抗压力;微丝作为绳索,将张力传递整个细胞,对细胞骨架的内在硬度起主要作用。微丝将细胞膜和所有内部组分拉向核心的细胞核。与微丝向内拉力相抵抗的压力构件是细胞外基质和细胞内的微管及交联微丝。中间纤维作为整合者,将微管和微丝相互连接起来并将它们连接到细胞膜和细胞核上。微丝、微管、中间纤维共同传递应力信号,但以微丝为主。最近的研究表明:微丝网本身就是一种张拉完整性结构^[8]。

Maniotis 等^[8]将微量吸管与细胞表面的粘附分子相连并往外拉,细胞骨架和细胞核的结构立即按照拉力的方向重新调整。细胞膜上某一局部的整合素受到应力刺激,将应力传递给细胞膜下粘着斑内的肌动蛋白(微丝的组分),再传递到整个细胞骨架,引起整个细胞骨架的重排,但构件的拓扑关系不变。细胞骨架按照应力的方向延伸,这可以解释肌肉、骨骼随着应力而生长,以及植物根部顺着重力而生长。应力使细胞骨架重排时使整个细胞骨架的内在硬度增加。细胞骨架的内在硬度与整合素所受的应力成正比,正是因为细胞骨架的张拉完整性造成的。内在硬度与应力成正比的现象在人造材料上很少见,在生物组织中多见。

细胞受到力学刺激前细胞骨架的应力大小和内在硬度对随后的细胞内反应非常重要。许多酶和其他控制蛋白合成、能量代谢和细胞生长的因子都是以物理方式固定在细胞骨架上,因此细胞骨架的几何形状和内在硬度的改变会影响细胞内的生化反应,如基因的激活和蛋白质的合成。细胞骨架的张拉完整性结构使细胞膜局部的粘附分子受到应力后导致整个细胞作出生化反应。这样力学信号通过细胞骨架的变形而转化为生化信号,从而启动一系列生化反

应,如压力敏感离子通道、腺苷酸环化酶及 PKC 的活性发生变化,使 PG、NO 和骨桥蛋白的含量升高,最终引起骨量的增加。

细胞通过整合素固定在基质上,当细胞脱离基质时,因细胞内细胞骨架的张拉完整性将细胞变成较圆的球形。当细胞通过整合素固定于基质时,通过张拉完整性将细胞变得扁平、展开、极化。扁平细胞内细胞骨架伸长,感到需要更多细胞来覆盖周围的基质,细胞的分裂激活。圆形的细胞表明基质上的细胞太多、空间有限,一些细胞必须死亡,细胞凋亡则开始启动。若骨组织所受的力负荷较大,骨细胞膜上的整合素受到基质的牵拉,细胞骨架得到一定程度的展开,使成骨细胞的增殖激活,使骨量增加。若骨组织所受的力负荷较小,骨细胞膜上的整合素感受不到基质的应力或应力减少,细胞骨架得不到充分伸展,骨细胞的凋亡将激活。这可能正是骨骼去负荷后骨量减少的原因。

4 骨组织的电信号传递

骨细胞作为力学感受器,感受到力负荷刺激后,必须将力学信号传递给成骨细胞,因为成骨细胞才是效应细胞,其信号是如何传递的呢?首先骨细胞、骨衬细胞、成骨细胞组成了多极,多联结网络,每个骨细胞与多个细胞联结。一个骨细胞的信号能传递给邻近细胞,直到整个骨表面的细胞。从以往实验可知,骨组织对 15~60Hz 的力负荷反应敏感^[9]。而化学信号如钙离子在细胞间的传递速度,相对于 30Hz 的力负荷来说,传递太慢。现在一般认为骨细胞间的信号传递为电信号,它的传递速度比化学信号(如第二信使)快得多。应变使骨细胞兴奋后,兴奋电信号通过缝隙连接传递到相邻的骨细胞和成骨细胞,促进成骨细胞的骨形成能力。

Zhang 等^[10]认为:骨组织受到循环力负荷产生应变—流动电位,引起细胞间的电流。根据细胞间联结子孔径及细胞突起的大小,以及细胞膜的面积和细胞体积,可以计算穿过成骨细胞膜的漏电流及电信号传递的延迟时间。骨细

胞间的突起连接,起着低频通过滤波器的作用,高频电信号通不过。骨组织间液进入骨小管后压力衰减的时间与电信号传遍整个骨表面细胞的延迟时间为同一数量级,时间的吻合可以使液体流动和电流的传递发生共振,频率为 30Hz。这样骨表面细胞间有一个放大的电位和电流,可以作为启动骨再建的信号,这也正是骨组织只对 15~60Hz 力负荷敏感的原因,因为只有这种频率的力负荷产生的液流才能和电流发生共振。骨组织的力负荷大多源于骨骼肌的收缩,而哺乳动物骨骼肌强直收缩的频率正好为 15~60Hz,与骨组织敏感的力负荷频率一致。也就是说骨骼对肌肉的强直收缩敏感,当肌肉以 15~60Hz 这种频率有力收缩时,常能引起骨组织的调节反应。这种频率的巧合只能归于生物进化的结果。

5 骨组织的重力负荷感受机制

骨组织的重力负荷感受机制是近来航天骨代谢研究的重点,现在问题的焦点在于重力负荷感受机制是在细胞水平上还是在组织水平上。也就是说,单个骨细胞或成骨细胞能否不依赖环境的变化而直接感受重力的变化,还是通过感受周围环境作用的应力变化而间接发觉重力的变化。长期航天飞行时肌肉骨骼系统的防护措施一定程度上依赖于此问题的解决。

物体所受的力分为接触力和非接触力。非接触力也称远作用力,如重力和电磁力;接触力如液体静压力、流体剪切力和粘着力。骨组织的力负荷环境调节骨形成和骨吸收的平衡,骨组织感受力负荷的变化,通过骨重建调节骨量和骨结构。

在地球上生物体内的骨细胞受到向下的重力、向上的浮力、液体静压力、流体剪切力和粘着力。人在地面所受最大的力为重力,但对于微观的细胞则不同,最大的受力为粘着力。骨陷窝中的骨细胞为椭圆形,骨细胞半轴约为 $a = 9\mu\text{m}$ 、 $b = 22\mu\text{m}$ 、 $c = 4\mu\text{m}$,体积约为 $88(\mu\text{m})^3 = 88 \times 10^{-12}(\text{cm})^3$,因骨细胞密度约为 1.1,则骨

细胞重量约为 1pN ,失重时为 0。骨细胞所受的浮力为 0.9pN ,其垂直方向重力和浮力的合力为 0.1pN ,失重条件下变为 0^[11]。

骨细胞可以通过整合素与基质形成粘着斑,骨细胞与基层最小距离可为 20nm。通常采用流体剪切力来研究细胞与基层的粘着力。目前还没有直接测量骨细胞与基层粘着力的资料,但可以假定骨细胞的粘着力类似于成纤维细胞,从而估计骨细胞的粘着力。成纤维细胞粘着于玻璃板上,当液体剪切力为 $350\text{dyn}/\text{cm}^2$ 时,大于 50% 的成纤维细胞开始脱落^[12]。可以把剪切力 $350\text{dyn}/\text{cm}^2$ 作为骨细胞脱离玻璃基层的剪切力,从而可以计算出骨细胞的粘着力为 6160pN ,而骨细胞重量为 1pN ,粘着力比重力大 3~4 个数量级。液体剪切力为 $5\text{dyn}/\text{cm}^2$ 就能使骨细胞发生反应,其数值大小约为粘着力的 1/70,但也相当于骨细胞重量的 93 倍。

骨细胞粘着力比其重量大这么多,重力的变化相对于粘着力来说,几乎可以忽略不计,似乎骨细胞不能直接感受重力的变化。但有资料表明重力方向能影响微管装配的结构^[11]。从牛脑中提取微管蛋白,当重力方向不同时微管蛋白装配成微管的形状不同。因为重力方向的不同,导致微管蛋白分布和流动的方式不同,形成不同的微管蛋白浓度。微管的装配和方向顺着微管蛋白的浓度,产生不同方向的微管,而微管是构成细胞骨架的重要元件,细胞骨架又是骨组织力学感受机制的重要一环,由此可以看出:重力能直接影响骨细胞的结构,骨细胞能直接感受重力的变化。但这观点还有待于进一步证实。也有人认为,就算骨细胞能直接感受重力的变化,也不太可能导致失重骨丢失,因为持续不变的力对骨重建影响很小,骨的调节反应只能识别变化的力。

从细胞水平来说,失重对骨的影响似乎很小;但从组织水平来说,失重对骨的力负荷影响则很大。骨组织的力负荷主要源于肌肉的主动收缩^[13]。肌肉通过费力杠杆,用多倍的力抵抗重力和外力。在失重环境下,重力负荷几乎为

零,骨组织的力负荷水平减少许多,从而导致骨量的减少。这似乎可以说:骨从组织水平感受重力的变化。骨组织的重力负荷感受机制还有许多不明之处,但从目前的研究结果来看,骨骼可能是在组织水平上靠感受接触力的变化而感受重力的变化,而不是在细胞水平上直接感受重力的变化。

6 小结

骨组织受力负荷后,应变驱使骨组织间液流动,使骨细胞膜上整合素发生变形,引起细胞骨架的重排,导致一系列的生化变化。骨细胞通过电信号将力负荷刺激信号传给整个骨表面细胞如成骨细胞,调节骨形成。骨组织靠感受接触力的变化而感受重力的变化。骨组织的力负荷感受机制还有许多不明白之处,有待于进一步的研究和完善。

参 考 文 献

- 1 Judex S, Gross T S. Strain gradient correlates with site of exercise-induced bone-forming surface in skeleton. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 1735-1745.
- 2 Palumbo C, Palazzini S, Marotti G. Morphological study of intercellular functions during osteocyte differentiation. *Bone*, 1990, 11: 401-406.

- 3 Klein-Nulend J, Semmeins CM, Ajubi NE. Pulsating fluid flow increases nitric oxide synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblast—correlation with prostaglandin up-regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 217: 640-648.
- 4 Williams JL, Iannotti JP, Chen JH. Effects of fluid shear stress on bone cells. *Biorheol*, 1994, 31: 163-170.
- 5 Horwitz AF. Integrins and health. *Scientific American*, 1997; 68-75.
- 6 Ning Wang, Butler JP, Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 1993, 260: 1124-1127.
- 7 Toma CD, Shkar SA, Grey ML. Signal transduction of mechanical stimuli is dependent on microfilament integrity: identification of osteopontin as a mechanically induced gene in osteoblast. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 1626-1636.
- 8 Ingber DE. The architecture of life. *Scientific American*, 1998; 30-39.
- 9 Lanyon LE. Function strain as a determinant for bone remodeling. *Calcif Tissue Int*, 1984, 36: s56-s61.
- 10 Zhang D, Cowin SC, Weinbaum S. Electrical signal transmission and gap junction regulation in bone cell network: a model for an osteon. *Ann Biomed Eng*, 1997, 25: 357-374.
- 11 Cowin SC. On mechanosensation in bone under microgravity. *Bone*, 1998, 22: 119s-125s.
- 12 Van Kooten TG, Schakenraad JM, Busscher HJ. Development and use of a parallel plate flow chamber for studying cellular adhesion to solid surfaces. *J Biomed Mater Res*, 1992, 26: 725-738.
- 13 Burr DB. Muscle strength, bone mass, and age-related bone loss. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 1547-1555.

亚太地区骨质疏松基金会举办首届骨质疏松培训班

2000年3月4~5日在香港会展中心举办亚太地区骨质疏松培训班。培训班主要内容有:骨质疏松流行病学和病理、细胞生物学、骨质疏松诊断、DEXA和超声的临床应用、双磷酸盐、雌激素受体、雌激素替代疗法、钙、维生素D₃治疗与应用、绝经后骨质疏松、继发性骨质疏松、男性骨质疏松、类固醇诱导的骨质疏松症等。

讲课专家: Steven R. Cummings (USA) Takuo Fujita (Japan) Ko-en-Hiang (Taiwan) Amir Khir (Malaysia) Edith Lau (Hong Kong) Keng-hong Leong (Singapore) Hirotoshi Morii (Japan) Ian R. Reid (New Zealand) Philip Sambrook (Australia) Ego Seeman (Australia)

大陆人员参加, 培训费 2 400 港元, 外国人参加, 培训费 300 美元。

欲知会议详情请致电以下机构:

Professor Edith Lau

Dept of Community & Family Medicine

Chinese University of Hong Kong

4/F Lek Yuen Health Centre

Shatin, N. T.

Hong Kong

Direct: (852) 26928778

Office: (852) 26928357

Fax: (852) 26063500

Email: edithlau@cuhk.edu.hk