

文章编号:1004-7220(2014)03-0241-07

# 体外冲击波通过三磷酸腺苷诱导人骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化

张佳亮, 王成学, 侯向锋, 黄玉龙, 于铁成

(吉林大学白求恩第一医院 创伤骨科, 长春 130021)

**摘要:** **目的** 研究体外冲击波是否通过三磷酸腺苷(ATP)激活 P2X<sub>7</sub> 受体,诱导人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)向成骨细胞分化。**方法** 培养 hMSCs 细胞,检测冲击波是否引起其向外释放 ATP;通过检测碱性磷酸酶(ALP)活性、骨钙素表达和钙结节形成,判断骨化形成和钙质沉积;用实时定量 PCR 检测 P2X<sub>7</sub> 受体的 mRNA 表达;用 ATP 水解酶、P2X<sub>7</sub> 受体的 siRNA 以及 P2 受体的抑制剂评估 ATP 释放和 P2X<sub>7</sub> 受体在冲击波诱导 hMSCs 成骨分化中的作用。**结果** 冲击波可引起细胞内 ATP 向外释放,冲击波和细胞外 ATP 能够诱导 hMSCs 向成骨分化,采用 ATP 水解酶、P2X<sub>7</sub> 受体的 siRNA 和抑制剂能够抑制冲击波引起的 hMSCs 成骨化作用。**结论** 冲击波通过引起细胞内 ATP 向外释放,激活 P2X<sub>7</sub> 受体传导信号通路,促进 hMSCs 向成骨细胞分化。本研究结果为冲击波促进骨折愈合和治疗骨不连疗法提供了理论依据。

**关键词:** 冲击波;人骨髓间充质干细胞;成骨分化

**中图分类号:** R 318.01 **文献标志码:** A

## Extracorporeal shockwaves induce osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by ATP release

ZHANG Jia-liang, WANG Cheng-xue, HOU Xiang-feng, HUANG Yu-long, YU Tie-cheng

(Department of Orthopedic Trauma, First Norman Bethune Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China)

**Abstract: Objective** To investigate whether extracorporeal shockwave could induce differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs) into osteoprogenitor cells by ATP release and the activation of P2X<sub>7</sub> receptors. **Methods** Cultured bone marrow-derived hMSCs were subjected to shockwave treatment and ATP release was assessed. Osteogenic differentiation and mineralization of hMSCs were evaluated by examining alkaline phosphatase (ALP) activity, osteocalcin (OC) production, and calcium nodule formation. The mRNA expression of P2X<sub>7</sub> receptors was determined with real-time RT-PCR. P2X<sub>7</sub>-siRNA, apyrase, and P2 receptor antagonists were used to evaluate the roles of ATP release and P2X<sub>7</sub> receptors in shockwave-induced osteogenic hMSCs differentiation. **Results** Shockwave treatment released significant amounts of ATP from hMSCs. Shockwaves and exogenous ATP induced hMSC differentiation. Removal of ATP with apyrase, targeting of P2X<sub>7</sub> receptors with P2X<sub>7</sub>-siRNA or selective antagonists prevented osteogenic differentiation of hMSCs. **Conclusions** Shockwaves can contribute to osteogenic differentiation of hMSCs by releasing cellular ATP that activate signaling. These research findings provide the theoretical basis for shockwave therapy in treating fracture healing and bone nonunion.

**Key words:** Shockwave; Human mesenchymal stem cells (hMSCs); Osteogenic differentiation

收稿日期:2013-03-05; 修回日期:2013-07-07

项目基金:国家自然科学基金资助项目(81172183)。

通信作者:于铁成,副教授, E-mail: tiechengyu@163.com。

尽管大量临床和实验数据显示冲击波能促进成骨,但是目前还不清楚冲击波促进骨愈合的确切机制<sup>[1-2]</sup>。创伤或机械刺激引起组织和细胞向外释放的三磷酸腺苷(ATP),对于骨再生的调节起着非常重要的作用<sup>[3-6]</sup>。细胞外ATP浓度升高,能够引起成骨细胞表面的P2X<sub>7</sub>受体激活,增进成骨细胞功能。细胞外核苷酸受体称为P2嘌呤受体(P2 purinergic receptors),主要包括P2X和P2Y两大家族<sup>[4,7]</sup>。P2X受体是一种配体门控离子通道,有7个亚型;胞外的ATP激活P2X受体,引起离子通透性改变,从而产生一系列生物学行为<sup>[7]</sup>。P2X<sub>7</sub>受体在多种组织中广泛表达,在细胞中有多种生理作用<sup>[7]</sup>。大量研究显示,人成骨细胞及其前体细胞亚群功能性表达P2X<sub>7</sub>受体,外界的机械刺激能够引起人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)的向成骨细胞分化<sup>[3-6, 9-11]</sup>;而冲击波作为一种机械刺激,能够引起细胞内ATP向外释放,增加细胞外ATP浓度<sup>[12]</sup>。基于上述研究结果,本文推测冲击波作为一种机械刺激,可通过引起细胞内ATP向外释放激活P2X<sub>7</sub>受体,诱导hMSCs向成骨细胞转化。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器设备和实验试剂

低温台式离心机(AERMLE Z383K,德国),高速冷冻离心机(KUBOTA KR-2000T,日本),液体闪烁计数仪(BACKMAN LS-6500,美国),紫外分光光度计(BACKMAN DU-640,美国),水平凝胶电泳槽(Mini-gel,日本),体外液波碎石机(MODEL KDE-2001,北京中科建安医疗技术公司),二氧化碳孵箱(RKI,日本),超净工作台(SW-CT-IFD,苏州),倒置显微镜(hund D-6330 Wetzlar 21,德国),三恒稳压电泳仪(ECP-3000,北京),电热恒温水浴箱(HHW 21.420,中国黄石),电子天平(ES-200A,中国沈阳)。

低糖DMEM(Sigma,美国),胎牛血清(Hyclone,美国),Percoll分离液(Pharmacia,美国),胰蛋白酶(Amresco,美国),抗CD73、CD105、CD34、CD29单克隆抗体(Sigma,美国),P2X<sub>7</sub>受体单克隆抗体(Millipore,美国),荧光标记羊抗兔抗体(中杉),碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(南京市建成生物工程研究

所)。P2受体抑制剂:苏明拉(suramin)50 mg(BIOMOL Research Laboratories Inc,美国)。ATP: apyrase 200 U(Sigma,美国)。P2X<sub>7</sub>受体阻滞剂:KN-62(BioSource Inc.,美国)1 mg。生物荧光试剂盒ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II(Roche Diagnostics GmbH,德国)。

### 1.2 hMSCs分离培养和鉴定

取人骨髓血标本15 mL,分离培养hMSCs<sup>[13]</sup>。取P4代的细胞用于本研究。应用以下共轭单克隆抗体分析P1代hMSCs在形态学上的同源性:CD34-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC), CD45-FITC, CD105-FITC(Ancell,美国), CD73-藻红蛋白(phycoerythrin, PE)(BD Pharmingen,美国)。加入胰蛋白酶后,用10% FBS冲洗hMSCs 2次,10<sup>6</sup>/mL细胞与CD105-FITC、CD34-FITC、CD29-FITC和CD73-PE抗体(效价为1:50)室温、避光下孵育15 min。PBS洗涤2次,500 μL PBS悬浮,流式细胞仪检测。采用BD FACSort仪器(Becton Dickinson)进行定量分析,以及Cell Quest软件(Becton Dickinson)对数据进行分析。

### 1.3 体外冲击波处理hMSCs、细胞活性评估及ATP释放量检测

采用工作电压7 kV、电容0.3 μF下产生的冲击波作用细胞<sup>[14]</sup>,冲击波能量密度为0.18 kJ/m<sup>2</sup>。用血细胞计数器通过0.4%台盼蓝(trypsin blue)染色来分析细胞数量和活性<sup>[14]</sup>。检测前细胞在37℃放置3 h。然后用0.18 kJ/m<sup>2</sup>冲击波作用细胞,加入100 μmol/L suramin以防ATP降解,同时设置空白对照。重复3次上述实验。

用检测ATP浓度的生物发光检定试剂盒(美国),检测细胞外的ATP剂量<sup>[12]</sup>。根据标准品计算ATP浓度,重复试验3次。

### 1.4 不同浓度ATP作用hMSCs

待P4代细胞种植于12孔板后第3 d,无菌条件下去除培养基,PBS洗涤2 min × 2次。将ATP以0.1、1、10、100、1 000 μm/L 5种浓度加入各培养孔室温下诱导6 min。去除诱导液,加入750 μL培养基,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>及100%饱和湿度条件的孵育箱培养。ATP作用P4代hMSCs后,培养14 d后检测ALP活性,培养30 d后检测骨钙素(osteocalcin, OC)和骨结节形成(茜素红染色)。

### 1.5 免疫荧光检测 P2X<sub>7</sub> 受体

取 P3 代细胞种植于共聚焦培养皿, PBS 洗涤 1 min × 3 次。用 4% 多聚甲醛 PBS 溶液于冰盒中固定细胞 10 min。1% 胎牛血清 PBS 溶液终止。PBS 洗涤 2 min × 3 次。用抗兔 P2X<sub>7</sub> 受体抗体(抗体:血清 = 1:100)标记, 4 °C 过夜, PBS 洗涤 3 min × 3 次。用羊抗兔的抗体结合室温下孵化 1 h, PBS 洗涤 3 min × 3 次。实验组一抗标记后于二抗孵育, 对照组只与二抗孵育, 免疫荧光显微镜观察。

### 1.6 免疫印迹检测 P2X<sub>7</sub> 受体表达

将冲击波 (0.18 kJ/m<sup>2</sup>, 100 次) 或 ATP (1 μmol/L, 5 min) 作用过的 hMSCs (10<sup>6</sup>/mL), 用冷却的缓冲溶液 Dulbecco's phosphate-buffered saline (KD Medical, Inc., 美国) 冲洗, 然后用 200 μL 的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 悬浮于离心管中, 其中含有蛋白酶抑制剂 (Sigma, 美国)。分离细胞膜和细胞质的蛋白样品。

将细胞膜和细胞质蛋白的样品用三甘氨酸聚丙烯酰胺梯度凝胶 (Novex, 美国) 电泳分离, 然后再将分离的蛋白转移到聚偏氟乙烯膜 (Millipore Corp., 美国) 上。将膜和鼠抗 β-actin 抗体 (Biomiga Inc, 美国) 和兔抗 P2X<sub>7</sub> 受体抗体 (Alomone Labs, 以色列) 共浴。将膜洗过后, 与辣根过氧化物酶结合的山羊第 2 抗体共浴。用 LumiGLO<sup>®</sup> 发光试剂 (Cell Signaling Technology, Inc., 美国) 通过 X 片检测。用图形软件 Image Tool 3.00 比较分析各样品间的差异, 通过与 β-actin 抗体比较, 分析样品 P2X<sub>7</sub> 受体表达程度。

### 1.7 hMSCs 成骨化鉴定

ALP 活性测定: 0.25% 胰蛋白酶消化提取各组细胞。按照试剂盒的说明书操作, 用酶标仪在 520 nm 波长处检测其光吸收值 (A 值), 计算 ALP 活性。

OC 蛋白检测: 冲击波作用后的细胞培养 30 d 后, 用氨基端和中段骨钙素检测试剂盒 (酶联免疫法, 96 人份/盒) (Biomedical Technologies, 美国) 检测细胞培养基中的 OC 蛋白。用酶标仪以 650 nm 为参照, 测定 450 nm 下的吸收光度<sup>[4,15]</sup>。

钙结节茜素红: 吸去培养基, 再 PBS 洗 2 次。加入 10% 中性甲醛, 固定 30 min。吸去固定液, PBS 洗涤 2 min × 2 次, 加入 0.1% 的茜素红染色液, 染色

10 min。用 PBS 洗 2 次, 风干, 以 1:1 体积比加二甲苯和丙酮, 室温下 5 min。酒精二甲苯脱水封片, 照相。每组 3 孔, 每孔随机选 5 个视野, 计数每个视野中矿化结节数量, 并用 Image-Pro Plus 5.0 图像分析软件测取每个视野下 (× 200) 钙结节面积 (以总像素数表示), 做定量分析<sup>[4,15]</sup>。

### 1.8 沉默 P2X<sub>7</sub> 受体

用转染试剂 Oligofectamine (Life Technologies, 美国) 将 P2X<sub>7</sub> 受体特异的 siRNA (P2X<sub>7</sub>R-siRNA) 和没有作用靶点的非特异 siRNA (Dharmacon, 美国) 转染给细胞 (最后的终浓度为 140 nmol/L)。简而言之, 用不带血清的培养基稀释, 将 Oligofectamine 轻轻混合, 在室温下孵育 10 min。P2X<sub>7</sub>R-siRNA 和对照 siRNA 与稀释的 Oligofectamine 混合后, 于室温下孵育 20 min。细胞离心后, 用无血清培养基洗涤 1 次, 将这些细胞和 siRNA 在无血清条件下分别培养 24、48、72 h, 然后用于实验。

### 1.9 检测 P2X<sub>7</sub> 受体的 mRNA 表达

通过实时定量 PCR (ABI Prism<sup>®</sup> 7300, 美国), 以 β-actin 作为内参, 评价冲击波和细胞外 ATP 对 hMSCs 的 P2X<sub>7</sub> 受体转录的影响<sup>[16]</sup>。用 P2X<sub>7</sub> mRNA 的引物序列见表 1。

表 1 P2X<sub>7</sub> mRNA 引物序列

Tab.1 Primer sequence of P2X<sub>7</sub> mRNA

基因	引物序列
P2X <sub>7</sub>	上游: 5'-ATC GGC TCA ACC CTC TCC TAG-3'
	下游: 5'-CTG GAG TAA GTG TCG ATG AGG AAG-3'
β-actin	上游: 5'-CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC-3'
	下游: 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT-3'

### 1.10 统计学分析

结果用均值 ± 标准差表示。各组间的差异采用统计学 t 检验和方差分析, P < 0.05 代表有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 hMSCs 表型特征

本实验采用较具代表性的 CD73、CD105、CD34 和 CD45 来检测, 通过流式细胞仪分析 P1 代 hMSCs 的纯度。流式细胞仪结果显示, 未诱导的 hMSCs 表

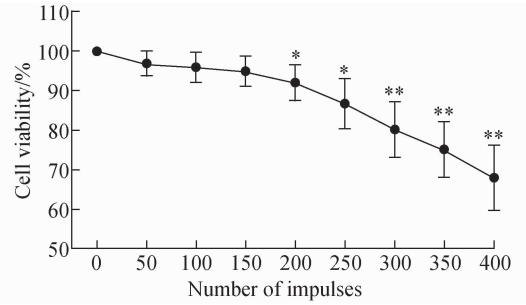
型 CD73 和 CD105 呈阳性, CD34 和 CD45 造血谱系和 内皮细胞标记则呈阴性; 提示本实验培养的细胞具备间充质干细胞的表面抗原标记的特点, 细胞成分均一, 具有高度的同源性, 符合骨髓间充质干细胞特征。

### 2.2 冲击波作用引起 hMSCs 向外释放 ATP

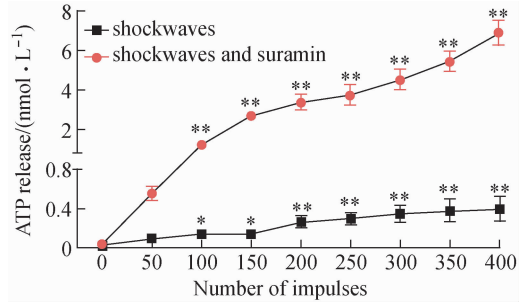
选择 P4 代 hMSCs 研究冲击波对细胞活性和 ATP 向外分泌的影响。当冲击波的作用次数 < 200 时, 冲击波对细胞的活性无显著影响。然而当冲击波的作用次数 ≥ 200 时, 细胞活性受到显著影响(见图 1(a)), 这些和冲击波引起的 ATP 向细胞外释放相平行, ATP 的释放量和冲击波的作用次数成正相关(见图 1(b))。腺苷由于细胞表面的三磷酸双磷酸酶(ecto-ATPases)能够快速水解细胞表面的 ATP, 在本实验中加入 100 μmol/L suramin, 阻止细胞外的 ATP 水解。结合细胞活性的数据可知, 释放到细胞外的 ATP 是细胞对细胞损害的反应, 释放到细胞外的 ATP 能很快被 hMSCs 的腺苷三磷酸双磷酸酶(apyrase)降解。

### 2.3 冲击波通过 P2X<sub>7</sub> 受体引起 hMSCs 向成骨分化

为检验冲击波或 ATP 是否能够引起 hMSCs 向成骨分化, 检测 hMSCs 的 ALP 活性、OC 产量和骨小结节形成(茜素红染色)。100 次 0.18 kJ/m<sup>2</sup> 强度的冲击波作用或 1 μmol/L 细胞外 ATP 作用下, hMSCs 的 ALP 活性、OC 产量会随着冲击波作用强度的增



(a) 冲击波作用引起细胞活性降低 (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01)



(b) 用 ATP 荧光试剂盒检测 ATP 的释放量 (\* P < 0.01, \*\* P < 0.001)

图 1 冲击波引起 ATP 向外细胞释放和 hMSCs 活性下降

Fig. 1 Shockwave treatment caused rapid ATP release and reduced hMSCs viability (a) Cell viability was reduced after shockwave treatment, (b) ATP release was determined with ATP bioluminescence assay

加而增加(见图 2), 故冲击波和细胞外的 ATP 作用能够诱导 hMSCs 形成骨结节。

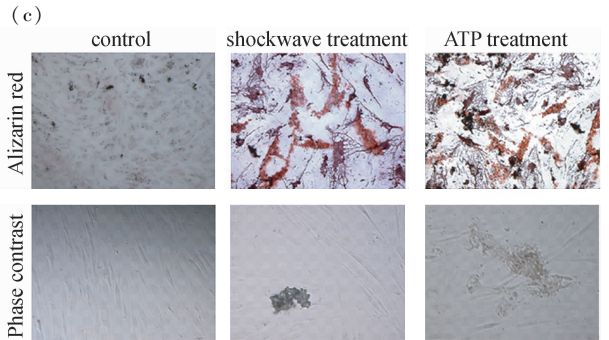
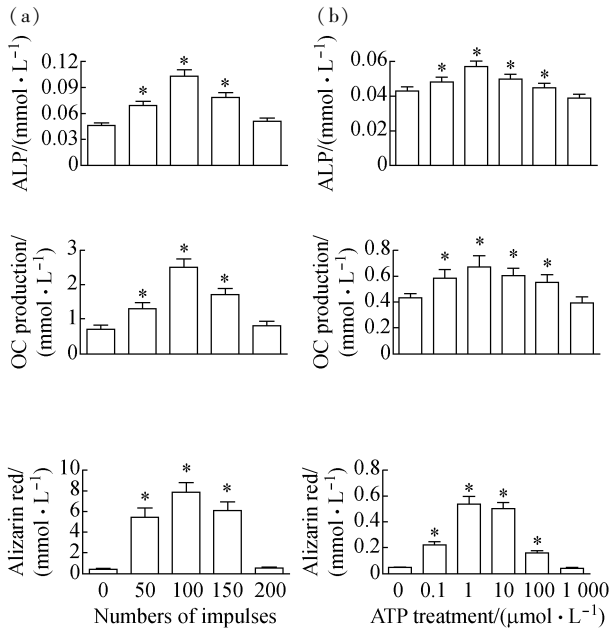


图 2 冲击波或 ATP 引起 hMSCs 向成骨细胞分化 (a) 冲击波引起 hMSCs ALP 活性、OC 产量和骨结节形成的变化, (b) ATP 引起 hMSCs ALP 活性、OC 产量和骨结节形成的变化 (\* P < 0.05), (c) 对照组、冲击波作用组和 ATP 作用组 P4 代 hMSCs 骨结节形成(上方为染色组放大 40 倍, 下方为染色组放大 100 倍)

Fig. 2 Shockwave or ATP treatment induced osteogenic differentiation of hMSCs (a) Effects of shockwave treatment on alkaline phosphatase activity, OC protein production, and formation of bone nodules, (b) Effects of ATP treatment on alkaline phosphatase activity, OC protein production, and formation of bone nodules, (c) Bone nodule formation in control group, shockwave treatment group and ATP treatment group (top images; magnification 40 ×, bottom images; magnification 100 ×)

预先用不同的 ATP 受体抑制剂作用细胞,然后用 100 次  $0.18 \text{ kJ/m}^2$  的冲击波或  $1 \mu\text{mol/L}$  ATP 作用细胞,  $\text{P2X}_7\text{R-siRNA}$  抑制了  $\text{P2X}_7$  受体的表达, apyrase、KN-62 ( $\text{P2X}_7$  受体特异抑制剂) 和 PPADS (非选择性的  $\text{P2X}_7$  受体抑制剂) 能够有效抑制冲击波诱导的 hMSCs ALP 活性和 OC 产量增加以及骨小结节形成(见图 3), 提示 ATP 释放和  $\text{P2X}_7$  受体激活是冲击波诱导 hMSCs 成骨所必需的。

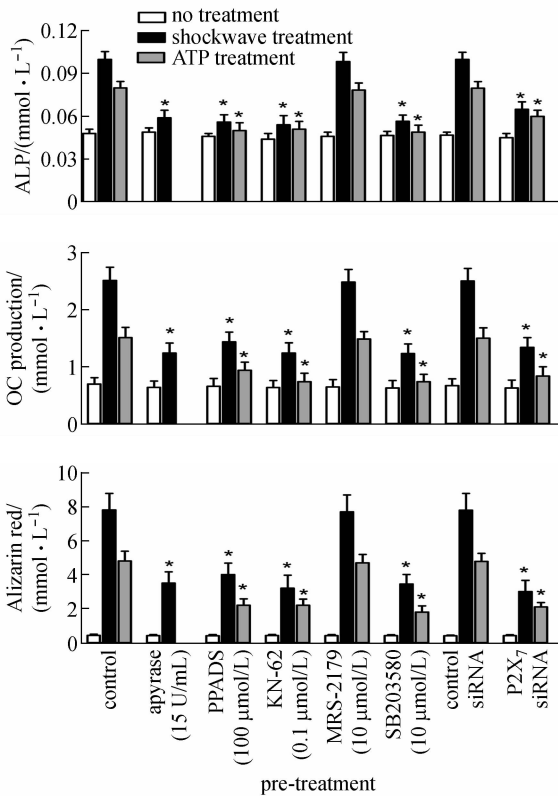


图3  $\text{P2X}_7$  受体和 p38 MAPK 信号通路参与冲击波和 ATP 引起的 hMSCs 向成骨细胞分化

Fig.3  $\text{P2X}_7$  receptors and p38 MAPK signaling were involved in osteogenic differentiation of hMSCs in response to shock-wave and ATP treatment

## 2.4 $\text{P2X}_7$ 受体在 hMSCs 的表达和功能

许多间质来源的细胞表达  $\text{P2X}_7$  受体<sup>[18]</sup>。本研究采用实时定量 PCR 和免疫组织化学方法探索 hMSCs 表达的  $\text{P2X}_7$  受体, 结果发现 hMSCs 表达  $\text{P2X}_7$  受体, 冲击波和细胞外 ATP 作用 1 h 后, 能够引起  $\text{P2X}_7$  受体的高表达(见图 4)。另外, 采用  $\text{P2X}_7\text{R-siRNA}$  可以有效抑制 hMSCs 的  $\text{P2X}_7$  受体表

达(见图 5)。综上所述,  $\text{P2X}_7$  受体的表达以及  $\text{P2X}_7$  受体表达的改变可能影响冲击波引起 hMSCs 向成骨分化。

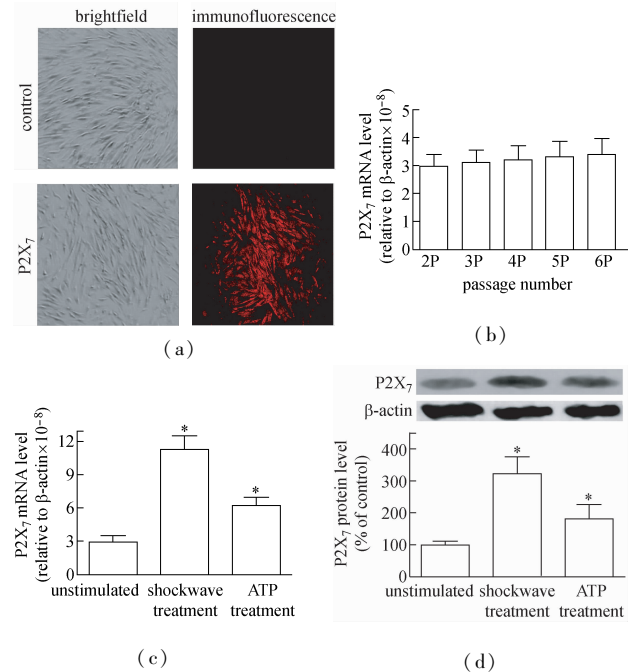


图4 冲击波引起 hMSCs 的  $\text{P2X}_7$  受体表达增加 (a) P4 代 hMSCs 的  $\text{P2X}_7$  受体在细胞表面的表达, (b) 不同传代的 hMSCs 的  $\text{P2X}_7$  受体 mRNA 表达, (c) 冲击波或 ATP 引起 hMSCs 的  $\text{P2X}_7$  受体 mRNA 表达变化, (d) 细胞表面的  $\text{P2X}_7$  受体和细胞质内的  $\beta$ -actin 表达 (\*  $P < 0.05$ )

Fig.4 Shockwaves induced  $\text{P2X}_7$  receptor expression (a) Expression of  $\text{P2X}_7$  receptor in hMSCs (P4) membrane, (b) mRNA expression of  $\text{P2X}_7$  receptor in hMSCs with different passages, (c) Effect of shock-wave treatment or ATP treatment on mRNA expression of  $\text{P2X}_7$  receptor, (d)  $\text{P2X}_7$  receptor protein levels in hMSC membrane preparation and  $\beta$ -actin levels in hMSC cytoplasm preparation

## 3 讨论

尽管冲击波疗法已在骨科得到广泛应用, 但是现在还不清楚冲击波促进骨折愈合的确切机制<sup>[19]</sup>。本研究探讨了冲击波引起的 hMSCs 骨分化反应是否能够解释冲击波疗效的机制, 发现 hMSCs 表达功能性的  $\text{P2X}_7$  受体, 冲击波通过促使细胞分泌 ATP, 引起 hMSCs 向成骨分化。显然体外培养的 hMSCs 能够自发分泌 ATP, 浓度为  $3 \sim 7.5 \text{ nmol/L}$ <sup>[20]</sup>。这一 ATP 浓度太低不能激活  $\text{P2X}_7$  受体。本研究发现, 冲击波能够引起高浓度的 ATP 向外释放(浓度高达  $7 \mu\text{mol/L}$ ), 这一浓度能够有效激活  $\text{P2X}_7$  受体



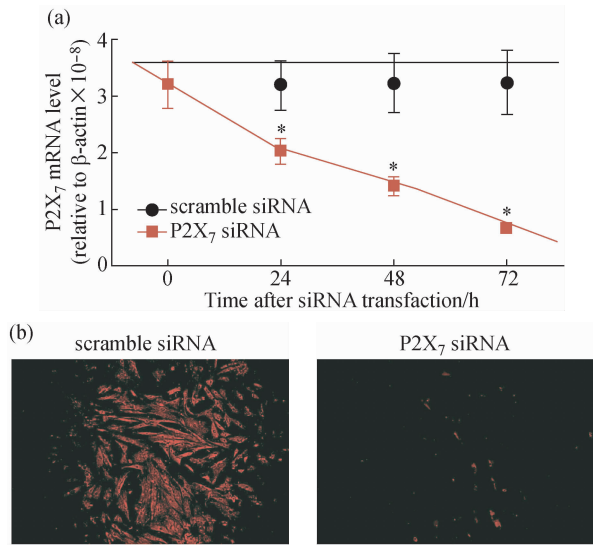


图5 siRNA有效沉默P2X<sub>7</sub>受体的表达 (a) P2X<sub>7</sub>受体 siRNA 或对照 siRNA 引起 P4 代 hMSCs 的 P2X<sub>7</sub>受体 mRNA 表达变化, (b) P2X<sub>7</sub> siRNA 引起 P4 代 hMSCs 的 P2X<sub>7</sub>受体的表达变化

Fig. 5 Silencing of P2X<sub>7</sub> receptor expression by siRNA (a) Effect of P2X<sub>7</sub> receptor-targeting siRNA or nonsense control siRNA on mRNA levels of P2X<sub>7</sub> receptor in hMSCs, (b) Effect of P2X<sub>7</sub> receptor-targeting siRNA on expression of P2X<sub>7</sub> receptors in hMSCs

信号通路,是诱导 hMSCs 向成骨分化的重要步骤。同时,本研究发现,消除细胞外的 ATP 和抑制 P2X<sub>7</sub> 受体能够抑制冲击波引起的骨分化,提示 ATP 释放、激活 P2X<sub>7</sub> 受体是引起成骨分化的上游信号通路。

本研究结果显示,过量的冲击波或 ATP 作用能够减弱 hMSCs 的反应(见图 2),推测是 P2X<sub>7</sub> 受体敏感性降低的结果<sup>[20]</sup>,也可能是由 P2X<sub>7</sub> 受体的双重特性决定。P2X<sub>7</sub> 受体表现为离子通道的特性,但是当受到持续的强烈的激动剂刺激时,P2X<sub>7</sub> 受体能够在细胞表面形成小孔,导致细胞死亡<sup>[22]</sup>。

现在普遍认为,细胞外的核苷酸通过细胞表面的受体(如 P2X<sub>7</sub> 受体)对骨细胞的功能调解起着非常重要的作用。本研究发现,hMSCs 表达 P2X<sub>7</sub> 受体,冲击波引起的细胞外 ATP 浓度增加能够激活这些受体。冲击波和细胞外 ATP 作用能够增加 P2X<sub>7</sub> 受体的表达和转录,引起下游信号通路的激活,导致 hMSCs 向成骨细胞分化。随着冲击波的作用次数增加,ATP 的释放将要增加。冲击波可能引起细胞的机械变形,从而导致动力敏感(离子)通道的开放,

引起 ATP 释放<sup>[14]</sup>。然而,本研究结果显示,至少一部分的细胞外 ATP 是由于细胞的完整性丢失引起的(见图 1)。

冲击波具有很强的促进成骨性<sup>[23]</sup>。本研究结果为这一观念提供了强有力的证据,即冲击波通过 P2X<sub>7</sub> 受体信号传导路,引起 hMSCs 向成骨细胞分化;冲击波作用引起 P2X<sub>7</sub> 受体表达增加,形成一个正反馈机制,进一步促进骨形成和骨折愈合。

综上所述,本研究证明 ATP 释放和 P2X<sub>7</sub> 受体信号传导路促进 hMSCs 向成骨细胞转化。这些研究支持前人的报道,即细胞外的 ATP 通过激活 P2X<sub>7</sub> 受体,引起成骨细胞的增殖和钙化作用<sup>[3]</sup>,故推测冲击波引起 hMSCs 释放 ATP,激活 P2X<sub>7</sub> 受体信号传到通路可能引起 hMSCs 向成骨分化、成骨细胞增殖以及钙化作用,增加骨不连病人的骨愈合。这可能是冲击波促进骨愈合的机制,但不是唯一的机制。相信本研究结果将要强化冲击波疗法对于骨科疾病如骨折、骨不连以及股骨头坏死的治疗潜能。

## 参考文献:

- [1] 王俊华,徐远红,王贤明,等. 体外冲击波对慢性足底筋膜炎症患者足底筋膜跟骨附着处微循环的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2012, 34(7): 541-544.
- [2] 于铁成,徐莘香. 冲击波原理和生物学作用[J]. 中华创伤骨科杂志, 2003, 5(3): 93-96.
- [3] Panupinthu N, Zhao L, Possmayer F, *et al.* P2X<sub>7</sub> nucleotide receptors mediate blebbing in osteoblasts through a pathway involving lysophosphatidic acid [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(5): 3403-3412.
- [4] 何学令,姚晓玲,冯贤,等. 力学刺激和成骨化学诱导剂对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化能力的影响[J]. 医用生物力学, 2011, 26(2): 116-120.  
He XL, Yao XL, Feng X, *et al.* Effects from mechanical stimulation and osteogenic chemical inductor on osteoblastic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(2): 116-120
- [5] 毛新建,宋关斌,罗庆,等. 微重力效应对骨髓间充质干细胞增殖分化影响的研究进展[J]. 医用生物力学, 2013, 28(1): 115-120.  
Mao XJ, Song GB, Luo Q, *et al.* Progress of microgravity effects on proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *J Med Biomech*, 2013, 28(1): 115-120.
- [6] 吴玉琼,房兵,江凌勇. 间歇牵拉应变对大鼠骨髓间充质干

- 细胞增殖与成骨分化的影响[J]. 医用生物力学, 2011, (6): 574-579.
- Wu YQ, Fang B, Jiang LY [J]. Effect of intermittent tensile strain on proliferation and osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(6): 574 -579.
- [7] Chen Y, Corriden R, Inoue Y, *et al.* ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors [J]. *Science*, 2006, 314(5806): 1792-1795.
- [8] 于铁成, 赵毅, 陈玮伦, 等. 冲击波通过 ATP 释放、P2 受体及激活 p38MAPK 激酶促进 T 细胞增殖和分泌白细胞介素 2 (英文) [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(31): 6305-6310.
- [9] 张鹏, 江凌勇, 吴玉琼, 等. 持续张应力对骨髓基质干细胞增殖及骨向分化的影响[J]. 医用生物力学, 2012, 27(2): 239-244.
- Zhang P, Jiang LY, Wu YQ, *et al.* Effect of continuous strain on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells [J]. *J Med Biomech*, 2012, 27(2): 239-244.
- [10] 于铁成, 朱振安. 力学因素在间充质干细胞构建功能性组织工程化软骨中的作用[J]. 医用生物力学, 2011, 26(5): 482-486.
- Yu B, Zhu ZA. Role of mechanobiology in mesenchymal stem cell-based tissue engineered cartilage [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(5): 482-486.
- [11] 袁琳, 宋关斌, 罗庆, 等. ERK 信号分子介导周期机械拉伸诱导的骨髓间充质干细胞增殖[J]. 医用生物力学, 2011, 26(3): 217-224.
- Yuan L, Song GB, Luo Q, *et al.* Proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells induced by cyclic mechanical stretch mediated with ERK signal molecules [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(3): 217-224.
- [12] Yu T, Junger WG, Yuan C, *et al.* Shockwaves increase T-cell proliferation and IL-2 expression through ATP release, P2X<sub>7</sub> receptors, and FAK activation [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 298(3): C457-64.
- [13] 孙晓江, 戴尅戎, 谢幼专, 等. 灌注型生物反应器中流速对人骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化的影响[J]. 医用生物力学, 2012, 27(5): 582-587.
- Sun XJ, Dai KR, Xie YZ, *et al.* Effect of perfusion flow rate on proliferation and osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *J Med Biomech*, 2012, 27(5): 582-587.
- [14] 于铁成, 刘一, 徐莘香. 冲击波对人 T 淋巴细胞增殖及分泌白细胞介素 2 的作用[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27(6): 321-324.
- [15] 马剑雄, 马信龙, 孙晓雷, 等. 体外培养成骨细胞对自体骨髓间充质干细胞定向成骨分化的影响[J]. 医用生物力学, 2009, 24(S1): 90.
- [16] Yip L, Woehrle T, Corriden R, *et al.* Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X<sub>7</sub> receptors [J]. *FASEB J*, 2009, 23(6): 1685-93.
- [17] Thompson BA, Storm MP, Hewinson J, *et al.* A novel role for P2X<sub>7</sub> receptor signaling in the survival of mouse embryonic stem cells [J]. *Cell Signal*, 2011, 24(3): 770-778.
- [18] 刘长剑, 刘建国, 于铁成, 等. 低能体外冲击波和低剂量间歇人重组甲状旁腺激素 1-34 刺激对体外培养大鼠成骨细胞增殖分化的影响[J]. 中华创伤骨科杂志, 2007, 9(11): 1062-1067.
- [19] Coppi E, Pugliese AM, Urbani S, *et al.* ATP modulates cell proliferation and elicits two different electrophysiological responses in human mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(7): 1840-1849.
- [20] Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, *et al.* The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X<sub>7</sub>) [J]. *Science*, 1996, 272(5262): 735-738.
- [21] Gunosewoyo H, Coster MJ, Kassiou M. Molecular probes for P2X<sub>7</sub> receptor studies [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(14): 1505-1523.
- [22] Lenertz LY, Gavala ML, Zhu Y, *et al.* Transcriptional control mechanisms associated with the nucleotide receptor P2X<sub>7</sub>, a critical regulator of immunologic, osteogenic, and neurologic functions [J]. *Immunol Res*, 2011, 50(1): 22-38.
- [23] Dorotka R, Kubista B, Schatz KD, *et al.* Effects of extracorporeal shock waves on human articular chondrocytes and ovine bone marrow stromal cells in vitro [J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2003, 123(7): 345-348.