

· 骨科专栏 ·

体外冲击波治疗通过激活 Wnt5a/Ca²⁺ 信号通路改善大鼠股骨牵张成骨的分子机制

黄康斌¹, 陈曾凤^{2*}, 陈从山¹, 张远洋¹, 邱志伟¹

(1.湖北省十堰市太和医院推拿科,湖北 十堰 442000;2.湖北省十堰市太和医院中西医结合科,湖北 十堰 442000)

[摘要] 目的 探究体外冲击波治疗通过激活 Wnt5a/Ca²⁺ 信号通路改善大鼠股骨牵张成骨的机制。方法 60只8周龄 Sprague Dawley 雄性大鼠分为对照组、股骨牵张模型组和体外冲击波疗法(extracorporeal shock wave therapy, SWT)组(n=20)。使用 Cat Walk XT 系统测量大鼠步态参数。通过显微 CT(Micro-CT)扫描分析大鼠股骨形态。组织病理学分级采用 Mankin 评分标准,并分析软骨下骨各区域 Wnt5a 阳性细胞百分比。实时聚合酶链反应分析大鼠股骨 I 型胶原和骨桥蛋白 mRNA 表达。免疫组织化学染色分析骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达。蛋白印迹分析 Wnt5a/Ca²⁺ 信号通路蛋白表达。结果 模型组摆动速度、最大接触面积、单站姿、占空比和支架摆动时间低于对照组,ESWT 组摆动速度、最大接触面积、单站姿、占空比和支架摆动时间高于模型组($P < 0.05$)。模型组骨小梁体积分数、小梁厚度和骨密度小于对照组,ESWT 组骨小梁体积分数、小梁厚度和骨密度大于模型组($P < 0.05$)。模型组股关节病理组织学(Mankin)评分高于对照组,Wnt5a 阳性细胞数量少于对照组,ESWT 组股关节 Mankin 评分低于模型组,Wnt5a 阳性细胞数量多于模型组($P < 0.05$)。与对照组相比,模型组大鼠软骨下骨板表层区可见骨细胞陷窝,ESWT 组股关节面损伤程度明显减轻($P < 0.05$)。ESWT 诱导模型大鼠 Wnt5a 标记明显增加($P < 0.05$)。模型组 I 型胶原和骨桥蛋白 mRNA 表达低于对照组,ESWT 组 I 型胶原和骨桥蛋白 mRNA 表达高于模型组($P < 0.05$)。模型组 BMP2、VEGF 和 PCNA 染色阳性细胞少于对照组,ESWT 组 BMP2、VEGF 和 PCNA 染色阳性细胞多于模型组($P < 0.05$)。模型组 CaMK II、PLC、Wnt5a 蛋白表达高于对照组,PKC 蛋白表达高于对照组,ESWT 组 CaMK II、PLC、Wnt5a 蛋白表达低于模型组,PKC 蛋白表达低于模型组($P < 0.05$)。结论 体外冲击波治疗通过激活 Wnt5a/Ca²⁺ 信号通路促进大鼠股骨牵张成骨新生血管形成、细胞增殖和成骨生长因子的表达,改善骨力学性能和骨矿化加速。

[关键词] 股骨;骨生成;牵张;体外冲击波疗法 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2024.01.009

[中图分类号] R687.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-3205(2024)01-0040-07

Molecular mechanism of extracorporeal shock wave therapy improving the distraction osteogenesis of rat femur by activating Wnt5a/Ca²⁺ signal pathway

HUANG Kang-bin¹, CHEN Zeng-feng^{2*}, CHEN Cong-shan¹,
ZHANG Yuan-yang¹, QIU Zhi-wei¹

(1. Department of Tuina, Taihe Hospital of Shiyan City, Hubei Province, Shiyan 442000, China;

2. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Taihe Hospital of
Shiyan City, Hubei Province, Shiyan 442000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of extracorporeal shock wave therapy (ESWT) to improve the distraction osteogenesis of rat femur by activating Wnt5a/Ca²⁺ signal. **Methods** Sixty 8-week-old Sprague Dawley male rats were divided into a control group, a femoral traction model group, and an ESWT group ($n=20$). Rat gait parameters were measured

[收稿日期]2023-02-13

[基金项目]十堰市科学技术局引导性科研项目(22Y39)

[作者简介]黄康斌(1992-),男,湖北十堰人,湖北省十堰市太和医院技师,医学学士,从事康复治疗研究。

* 通信作者。E-mail:284133170@qq.com

using the CatWalk XT system, and the morphology of rat femur was analyzed through Micro-CT scanning. The histopathological grading was performed using the Mankin scoring standard, and the percentage of Wnt5a positive cells in each region of the subchondral bone was analyzed. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to analyze type I collagen and osteopontin mRNA expression in rat femur. Immunohistochemical staining was used to analyze the expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP2), vascular endothelial growth factor (VEGF), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Western blot was used to analyze Wnt5a/Ca²⁺ signaling pathway protein expression. **Results** The swing speed, maximum contact area, single standing posture, duty cycle and stent swing time of rats in the model group were lower than those in the control group, while the swing speed, maximum contact area, single standing posture, duty cycle and stent swing time of rats in the ESWT group were higher than those in the model group ($P < 0.05$). The trabecular volume fraction, trabecular thickness and bone mineral density of rats were lower in the model group than in the control group, but higher in the ESWT group than in the model group ($P < 0.05$). The Mankin score of the femoral joint in the model group was higher than that in the control group, while the number of Wnt5a positive cells in the model group was lower than that in the control group; The Mankin score of the femoral joint in the ESWT group was lower than that in the model group, while the number of Wnt5a positive cells in the ESWT group was higher than that in the model group ($P < 0.05$). Compared with the control group, osteocyte lacunae could be seen in the superficial area of subchondral bone plate in the model group, and the degree of injury on the femoral joint surface in the ESWT group was significantly reduced ($P < 0.05$). The Wnt5a marker of ESWT-induced model rats increased significantly ($P < 0.05$). The expression of type I collagen and osteopontin mRNA was lower in the model group than in the control group, but higher in the ESWT group than in the model group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the positive cells of BMP2, VEGF and PCNA staining in the model group decreased, while the positive cells of BMP2, VEGF and PCNA staining in the ESWT group increased, as compared with the model group ($P < 0.05$). The expression of CaMK II, PLC and Wnt5a protein and the expression of PKC protein in the model group were higher than those in the control group, while the expression of CaMK II, PLC and Wnt5a protein and the expression of PKC protein in the ESWT group were lower than those in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** ESWT can promote the formation of angiogenesis, cell proliferation and the expression of osteoblast growth factors by activating the Wnt5a/Ca²⁺ signaling pathway, improve the bone mechanical performance and accelerate bone mineralization.

[Key words] Femur; Osteogenesis; Distraction; Extracorporeal shock wave therapy

牵张成骨(distraction osteogenesis)用于刺激新骨形成,以治疗由骨缺损引起的骨科疾病,可以从股骨到下颌骨的各种骨头上进行牵引^[1]。经过短的潜伏期后,逐渐和控制牵引两个骨碎片,直到所需的长度。牵引完成后,允许新形成的骨愈合,直到完全巩固。然而,较长的治疗时间和在某些情况下可能出现纤维愈合或不愈合仍然是阻碍进一步临床应用的主要限制因素,故开发加速骨化再生的程序显然是可取的。体外冲击波(extracorporeal shock wave,ESW)疗法是美国食品和药物管理局批准的一种治疗人类肌肉骨骼疾病的方式,如足底筋膜炎

和肘部外侧上髁炎^[2]。ESW的应用是一种新兴的无创骨病治疗方法,该新型的机械刺激促进成骨,从而抑制骨重塑过程中的破骨细胞活性和软骨退变^[3-4]。经短期或长期治疗后,体外和体内已有ESW通过成骨细胞分化和增殖对成骨激活的积极作用报道^[5]。Wnt/catenin和Wnt/钙(Ca²⁺)信号通路在调节骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stemcells,BMMSCs)分化中发挥重要作用,Wnt5a/Ca²⁺信号可抑制BMMSCs的自我重建和刺激成骨分化^[6]。因此,推测ESW治疗(extracorporeal shock-wave therapy,ESWT)

可以调节 Wnt/Ca²⁺ 信号通路改善骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 大鼠的临床症状。本研究通过微计算机断层扫描测量、组织损伤的组织学评估和步态分析来检查 ESW 对 OA 大鼠的治疗效果。

1 材料与方 法

1.1 实验大鼠 60 只 8 周龄 Sprague Dawley 雄性大鼠 (170~190 g) 购自农科院动物研究所。大鼠被安置在 (23±1)℃、12 h 明暗循环的环境下, 期间大鼠可随意获得食物和水。在实验开始前进行 1 周的适应。分为对照组、模型组和冲击波治疗组 (ESWT 组), 每组 20 只。对照组不作任何干预即进行采样。

模型组采用动态轴向固定器 (Orthofix M-100) 固定大鼠后于静脉注射戊巴比妥 5 mg/kg 麻醉大鼠股骨前表面 (针的直径为 0.25 mm)。用骨锯在骨干中心截骨, 用 0.2 mm 的 1.5 号尼龙线缝合骨膜。等待 1 周后, 以 2 次/d、0.1 mm/次 (0.2 mm/d) 的速度牵拉愈伤组织 2 周, 可获得 2.0 mm 的伸长。采样时机为干预结束后第 2 天。

ESWT 组前期处理同模型组, 继而股骨外侧施加冲击波。体外冲击波治疗使用非聚焦气弹道装置 (瑞士 EMS 体外冲击波治疗仪)。冲击波聚焦是通过使用辅助装置从 2 个方向通过 X 射线照射确定的。冲击波能量密度为 0.42 mJ/mm², 脉冲间隔为 2 Hz。在分散的愈伤组织的中心和外围部位共注射 100 次, 共注射 300 次。采样时机为干预结束后第 2 天。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠步态分析 在 CatWalk 系统中, 大鼠被放置在玻璃板走道上, 允许自由行走。荧光灯发射在玻璃板的一侧, 并完全在内部反射。当爪子接触到玻璃板时, 光线向下反射, 被识别为明亮的爪印图像。这些爪印被放置在人行道下方的摄像机捕捉到, 并通过软件 (CatWalk XT version 9) 进行分析, 该软件生成静态步态参数, 如接触面积和爪压, 以及与步骤持续时间相关的动态步态参数。该软件可自动显示共 5 个步态参数, 包括摆动速度、最大接触面积、单站姿、占空比和支架摆动时间, 大鼠行走 10 次。从 10 次记录的散步中选择了 3 次不间断的散步。

1.2.2 显微 CT 扫描下软骨下骨测量 麻醉后第 8 周, 使用 micro-CT (micro-CT 由 CAMS & PUMC 实验室动物科学研究所提供, 小动物活体 PET/CT 成像系统, Germany), 电压 70 kV, 电流 142 A, 暴露时间 1 475 ms, 1 mm 铝滤镜, 0.5° 旋转步长, 18 μm 分辨率。用局部阈值算法对所有数据集进行分割。

得到的图像投影采用改进的费尔德坎普反投影进行重建。利用内置软件进行皮质骨分离。测量胫骨骨髓处骨小梁厚度和体积以及骨小梁体积分数和骨密度。

1.2.3 组织病理学分析 处死大鼠, 快速取出完整股关节, 在 4% 甲醛溶液中固定 48 h, 在 10% 乙二胺四乙酸 (pH 7.4) 溶液中脱钙 3 周。用 ASP200S 水萃取器对组织进行脱水, 并嵌入石蜡。用显微镜 (Leica RM2235) 将外侧关节间室垂直切成 4 μm 厚的切片, 用苏木精和伊红染色。OA 病理分级按 Mankin 评分标准执行。在二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、过氧化氢阻断和抗原提取后, 切片与 Wnt5a 一抗 (Abcam 公司, 英国) 孵育 12 h, 随后用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育。显微镜下观察并记录阳性染色, 在同一标本的 3 个切片中随机选取 6 个区域进行挑选。所有的图像都是用 Cool CCD 相机 (SNAP-Pro c.f. 数码套件), 使用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件 (Media Cybernetics) 分析软骨下骨各区域的 Wnt5a 阳性细胞百分比。

1.2.4 半定量实时聚合酶链反应检测各组 I 型胶原和骨桥蛋白 mRNA 表达 根据制造商说明, 用 TRIzol 试剂 (赛默飞世尔科技公司, 美国) 分离细胞总 RNA。第一链 cDNA 由 1 mg 总 RNA 合成, 使用 ExScript RT 试剂试剂盒, 按照操作手册进行合成。PCR 使用 PCR 热循环器 Dice (Takara Bio 公司, 美国) 中的铂 Taq DNA 聚合酶 (Invitrogen 公司, 美国)。甘油醛 3-磷酸脱氢酶作为内标。用 2^{-ΔΔCt} 值计算 I 型胶原和骨桥蛋白 mRNA 的表达量。

1.2.5 免疫组织化学染色各组 BMP2、VEGF 和 PCNA 染色阳性细胞数量 股骨固定在 4% 磷酸盐缓冲液缓冲多聚甲醛中 48 h, 在磷酸盐缓冲液缓冲 10% 乙二胺四乙酸中脱钙。将脱钙骨包埋在石蜡中, 纵向切成 5 mm 厚的切片。骨标本转移到聚赖氨酸包被玻片上进行苏木精-伊红染色, 检测骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的表达。使用辣根过氧化物酶-3, 3-二氨基联苯胺细胞和组织染色试剂盒 (R&D 公司, 美国) 证实标本的免疫反应性。抗 PCNA, s 期细胞分裂的标志; Santa Cruz 公司, 美国)、anti-BMP2 和 anti-VEGF (R&D 公司, 美国) 作为免疫组织化学抗体。

1.2.6 蛋白印迹分析各组钙调蛋白激酶 II

(calmodulin protein kinase II, CaMK II)、PLC、Wnt5a 蛋白表达 ESWT 后,收集股关节组织,用 PBS 洗涤 3 次,提取组织中的总蛋白,并按照前面描述的进行量化。采用标准程序,总蛋白用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转移到硝化纤维素膜上。用 5% 胎牛血清在含 0.1% Tween-20 的 tris 缓冲盐水中阻断非特异性位点。用摄影胶片 (Kodak, Rochester, NY, USA) 和 Tanon Gis(上海碧云天公司)对钙-CaMK II、PLC、PKC、Wnt5a 蛋白表达进行检测和定量。一抗包括兔多克隆抗 Wnt5a (ab174100), 抗 CaMK II (ab19031), 抗 PLC(ab185724), 抗 PKC(sc-25778, 1:200, Santa Cruz 公司, 美国) 稀释, 并根据制造商说明与硝化纤维素膜共孵育。二抗为 IRDye 680 山羊抗大鼠 (Abcam 公司, 美国)。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 20.0 统计软件分析数据。计量资料比较采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠步态参数分析 模型组大鼠摆动速度、最

大接触面积、单站姿、占空比和支架摆动时间低于对照组, ESWT 组大鼠摆动速度、最大接触面积、单站姿、占空比和支架摆动时间高于模型组, 差异有统计学意义 (P < 0.05), ESWT 线束改善模型大鼠步态参数。见图 1, 表 1。

2.2 大鼠股骨形态分析 模型组大鼠骨小梁体积分数、小梁厚度和骨密度小于对照组, ESWT 组骨小梁体积分数、小梁厚度和骨密度大于模型组, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 2。

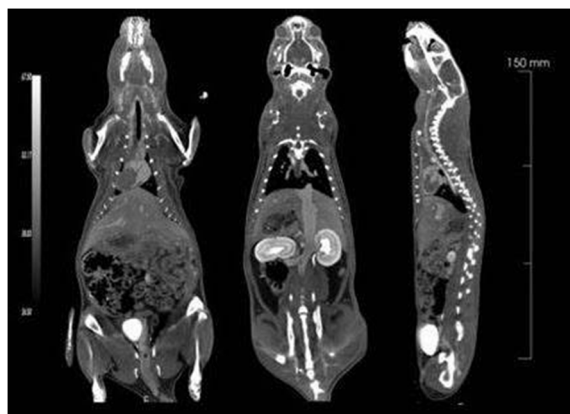


图 1 大鼠模型的 Micro-CT 图像

Figure 1 Micro-CT images of rat models

表 1 大鼠步态参数分析

Table 1 Analysis of gait parameters in rats

组别	摆动速度(mm/s)	最大接触面积(mm ²)	单站姿(s)	占空比(%)	支架摆动(s)
对照组	1 193.26 ± 45.25	52.07 ± 5.88	0.15 ± 0.02	64.27 ± 4.19	0.62 ± 0.11
模型组	653.29 ± 21.68*	27.46 ± 3.24*	0.07 ± 0.01*	44.24 ± 3.66*	0.29 ± 0.07*
ESWT 组	973.44 ± 30.34 [#]	47.21 ± 5.01 [#]	0.13 ± 0.01 [#]	59.30 ± 3.88 [#]	0.58 ± 0.09 [#]
F 值	10.662	9.684	13.125	9.052	11.883
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* P 值 < 0.05 与对照组比较 # P 值 < 0.05 与模型组比较(LSD-*t* 检验)

表 2 大鼠股骨形态分析

Table 2 Morphological analysis of rat femur

组别	骨小梁体积 分数(%)	小梁厚度 (μm)	骨密度
对照组	39.88 ± 5.32	48.25 ± 5.33	965.32 ± 44.18
模型组	21.37 ± 3.25*	36.52 ± 3.75*	547.38 ± 24.67*
ESWT 组	34.59 ± 4.11 [#]	52.77 ± 5.79 [#]	836.74 ± 36.42 [#]
F 值	12.034	9.668	15.337
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

* P 值 < 0.05 与对照组比较 # P 值 < 0.05 与模型组比较(LSD-*t* 检验)

2.3 组织病理学评估 模型组大鼠股关节 Mankin 评分高于对照组, Wnt5a 阳性细胞数量少于对照组, ESWT 组股关节 Mankin 评分低于模型组, Wnt5a 阳性细胞数量多于模型组, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 3。组织病理学分析显示, 与对

照组相比, 模型组大鼠软骨下骨板浅表区可见骨细胞陷窝, ESWT 组股关节面损伤程度明显减轻 (P < 0.05)。免疫组织化学评估 Wnt5a 蛋白在软骨下骨板中的表达, ESWT 诱导模型大鼠 Wnt5a 标记明显增加 (P < 0.05)。

表 3 大鼠组织病理学评估

Table 3 Pathological evaluation of rat tissue

组别	Mankin 评分(分)	Wnt5a 阳性细胞(%)
对照组	2.44 ± 0.36	52.84 ± 6.33
模型组	9.71 ± 1.02*	18.63 ± 4.19*
ESWT 组	4.53 ± 0.66 [#]	56.37 ± 8.25 [#]
F 值	14.824	10.103
P 值	<0.001	<0.001

* P 值 < 0.05 与对照组比较 # P 值 < 0.05 与模型组比较(LSD-*t* 检验)

2.4 实时聚合酶链反应分析 模型组 I 型胶原和骨桥蛋白 mRNA 表达低于对照组,ESWT 组 I 型胶原和骨桥蛋白 mRNA 表达高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 实时 PCR 分析

Table 4 Real-time PCR analysis

($n = 20, \bar{x} \pm s$)

组别	I 型胶原	骨桥蛋白
对照组	1.85 ± 0.12	1.96 ± 0.18
模型组	1.12 ± 0.03 *	1.03 ± 0.02 *
ESWT 组	1.91 ± 0.18 #	1.95 ± 0.15 #
F 值	14.036	9.885
P 值	<0.001	<0.001

* P 值 < 0.05 与对照组比较 # P 值 < 0.05 与模型组比较(LSD- t 检验)

2.5 免疫组织化学分析 模型组 BMP2、VEGF 和 PCNA 染色阳性细胞少于对照组,ESWT 组 BMP2、VEGF 和 PCNA 染色阳性细胞多于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$),ESWT 处理促进牵张区的成骨因子表达和细胞增值。见表 5。

表 5 免疫组织化学分析

Table 5 Immunohistochemical analysis

($n = 20, \bar{x} \pm s$)

组别	BMP2	VEGF	PCNA
对照组	1.93 ± 0.18	1.88 ± 0.15	1.95 ± 0.16
模型组	1.04 ± 0.03 *	1.07 ± 0.04 *	1.12 ± 0.10 *
ESWT 组	1.86 ± 0.12 #	1.91 ± 0.18 #	1.90 ± 0.15 #
F 值	14.812	9.775	12.624
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

* P 值 < 0.05 与对照组比较 # P 值 < 0.05 与模型组比较(LSD- t 检验)

2.6 Wnt5a/Ca²⁺ 信号通路蛋白分析 模型组 CaMK II、PLC、Wnt5a 蛋白表达低于对照组,PKC 蛋白表达高于对照组,ESWT 组 CaMK II、PLC、Wnt5a 蛋白表达高于模型组,PKC 蛋白表达低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 6,图 2。

表 6 Wnt5a/Ca²⁺ 信号通路蛋白分析

Table 6 Analysis of Wnt5a/Ca²⁺ signaling pathway proteins

($n = 20, \bar{x} \pm s$)

组别	CaMK II	PLC	PKC	Wnt5a
对照组	1.95 ± 0.13	1.98 ± 0.19	1.04 ± 0.03	1.86 ± 0.16
模型组	1.14 ± 0.07 *	1.05 ± 0.03 *	1.88 ± 0.14 *	1.12 ± 0.05 *
ESWT 组	1.87 ± 0.15 #	1.91 ± 0.15 #	1.13 ± 0.05 #	1.90 ± 0.17 #
F 值	11.250	13.683	10.449	14.264
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* P 值 < 0.05 与对照组比较 # P 值 < 0.05 与模型组比较(LSD- t 检验)

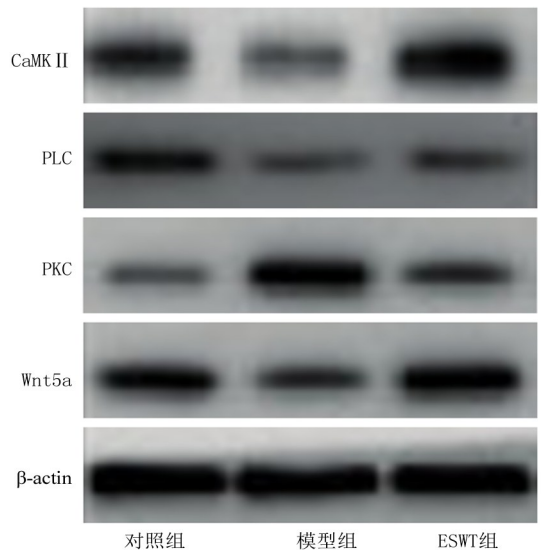


图 2 蛋白印迹分析 Wnt5a/Ca²⁺ 信号通路蛋白表达

Figure 2 Western blot analysis of Wnt5a/Ca²⁺ signaling pathway protein expression

3 讨论

牵张成骨是一种独特的外科技术,新骨在不使用供体移植物的情况下重新形成,其主要优点是同时牵张周围软组织包膜^[7]。ESWT 是一种新兴的非侵入性肌肉骨骼疾病的治疗方法^[8-9]。ESWT 通过增加细胞分化和血管新生来促进长骨骨折的愈合。ESWT 增加了兔长骨骨折中骨组织的愈合组织大小和生物力学特性,ESWT 诱导的骨再生增强似乎受成骨生长因子的表达和骨髓间充质细胞的成骨分化的调控^[10]。这些发现暗示 ESWT 可能诱导软组织再生和长骨巩固。牵张成骨是在可控机械刺激下的一种活跃的骨再生过程。牵张成骨术已在颅面领域获得广泛的临床应用,用于先天性和获得性畸形的治疗^[11-13]。ESWT 的机械刺激通过膜超极化和自由基形成 2 种途径转化为生物效应。细胞膜超极化诱导后 Ras 激活,通过转化生长因子 $\beta 1$ 和 VEGF 促进骨髓基质细胞生长和向骨祖细胞的分化。张力一应激被认为是间充质干细胞招募的关键刺激因子,伴随着生长因子的表达,只要维持牵张,生长因子的表达就会增加,而在牵张结束时,生长因子的表达就会减少^[14-15]。ESWT 是一种新的非手术治疗方法,它产生的机械刺激能够通过增加分化和血管化来促进骨再生。体外冲击波疗法增强血管形成,诱导成骨生长因子,刺激间充质细胞向成骨谱系分化,体外冲击波治疗在牵张成骨过程中加速了骨再生,而这些作用是通过调节成骨和血管生成生长因子的表达来介导的^[16-17]。

Wnt5a 是非典型 WNT 信号的重要成员,触发

CAMK II 通路和 NFAT 转录因子,由 Ca^{2+} -CaN 通路激活。它还调节小鼠肢体发育中的 PCP 信号通路。Wnt5a 在小鼠肢体形态发生过程中 PCP 的调控中发挥着结构性和许可性作用。在小鼠体内爪子形成过程中 Wnt5a 促进的 Ca^{2+} 信号通路, Wnt5a- Ca^{2+} -CaNNFAT 信号调控软骨形成,促进细胞对成软骨信号的能力,并在爪子发育过程中促进软骨分化中发挥许可作用。通过体外细胞培养证明 Wnt5a- Ca^{2+} -CaN-NFAT 途径促进软骨形成。

本研究证实 ESWT 通过激活 Wnt5a/ Ca^{2+} 信号对模型大鼠的治疗作用,使 ESWT 可以激活 Wnt5a/ Ca^{2+} 信号。此外, Wnt5a、PKC、PLC 和 CaMK II 等相关基因和蛋白表达水平也受到影响。ESWT 促进软骨下骨重建。ESWT 可以改善模型大鼠的症状。ESWT 可能影响分子的表达,也可能直接影响能量相关神经纤维的表达,进而表现出模型大鼠的改善,进一步的实验可能会证实这一问题。ESWT 可修复软骨下骨浅表区胶原蛋白,从而降低组织结构病理改变的 Mankin 评分。说明,ESWT 通过干预模型大鼠早期向中期的过渡发挥了其有益作用,并可能抑制牵张成骨的发展。ESWT 的目的是促进软骨和软骨下骨的修复和重建。BMMSCs 的成骨分化在这些过程中起着关键作用。ESWT 有促进细胞生长和代谢、刺激毛细血管生长、促进组织修复等作用。骨组织中细胞因子的分泌引起生物化学和分解代谢反应,以应对生物物理刺激,以适应细胞外刺激。局部血管供应的增加是骨折成功愈合所需的重要生物反应之一^[18-19]。本研究结果显示,与模型组相比,ESWT 上调了 BMP2、VEGF 和 PCNA 的表达。这表明 ESWT 增加了股骨的血管生成和骨再生,从而加速骨巩固。BMP2 和 VEGF 可能作为有丝分裂原或化学吸引调节剂,促进牵张区迁移、增殖和成熟,并增加血管形成,导致颗粒组织转化为骨组织^[20]。然而,骨折通过改变几种促进骨形成的生长因子对生物物理刺激作出反应。因此,ESWT 可能直接或间接改变其他成骨生长因子和相关细胞因子的表达,这些因子在分散的股骨微环境中促进新骨再生和巩固。

综上所述,ESWT 通过激活 Wnt5a/ Ca^{2+} 信号通路促进大鼠股骨牵张成骨新生血管形成、细胞增殖和成骨生长因子的表达,改善骨力学性能和骨矿化加速。

[参考文献]

[1] Alshihri A, Niu W, Kämmerer PW, et al. The effects of shock

wave stimulation of mesenchymal stem cells on proliferation, migration, and differentiation in an injectable gelatin matrix for osteogenic regeneration [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2020, 14(11): 1630-1640.

- [2] Azmaz NT, Bozkurt SB, Hakki SS, et al. Warm gutta-percha techniques regulate cell viability, heat shock, and mineralized tissue-associated proteins of cementoblasts [J]. *J Endod*, 2020, 46(7): 957-963.
- [3] Bereket C, Çakir-Özkan N, Önger ME, et al. The effect of different doses of extracorporeal shock waves on experimental model mandibular distraction [J]. *J Craniofac Surg*, 2018, 29(6): 1666-1670.
- [4] Buarque de Gusmão CV, Batista NA, Vidotto Lemes VT, et al. Effect of low-intensity pulsed ultrasound stimulation, extracorporeal shockwaves and radial pressure waves on Akt, BMP-2, ERK-2, FAK and TGF- β 1 during bone healing in rat tibial defects [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2019, 45(8): 2140-2161.
- [5] Cao J, Zhang C, Huang H, et al. Bone marrow edema syndrome of the foot treated with extracorporeal shock wave therapy: a retrospective case series [J]. *J Foot Ankle Surg*, 2021, 60(3): 523-528.
- [6] Volpini X, Ambrosio LF, Fozzatti L, et al. Trypanosoma cruzi exploits wnt signaling pathway to promote its intracellular replication in macrophages [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 859.
- [7] Chen Q, Xia C, Shi B, et al. Extracorporeal shock wave combined with teriparatide-loaded hydrogel injection promotes segmental bone defects healing in osteoporosis [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2021, 18(6): 1021-1033.
- [8] Du Z, Li Z, Wang P, et al. Revealing the effect of skull deformation on intracranial pressure variation during the direct interaction between blast wave and surrogate head [J]. *Ann Biomed Eng*, 2022, 50(9): 1038-1052.
- [9] Frederick SW, Cross AR. The effect of extracorporeal shockwave on liposomal bupivacaine in a tibial plateau leveling osteotomy model [J]. *Vet Surg*, 2020, 49(8): 1503-1508.
- [10] Ginini JG, Emodi O, Sabo E, et al. Effects of timing of extracorporeal shock wave therapy on mandibular distraction osteogenesis: an experimental study in a rat model [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2019, 77(3): 629-638.
- [11] Ginini JG, Maor G, Emodi O, et al. Effects of extracorporeal shock wave therapy on distraction osteogenesis in rat mandible [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2018, 142(6): 1501-1509.
- [12] Haberal B, Šimšek EK, Akpınar K, et al. Impact of radial extracorporeal shock wave therapy in post-laminectomy epidural fibrosis in a rat model [J]. *Jt Dis Relat Surg*, 2021, 32(1): 162-169.
- [13] Hernigou J, Verdonk P, Homma Y, et al. Nonoperative and operative bone and cartilage regeneration and orthopaedic biologics of the hip: an orthoregeneration network (ON) foundation hip review [J]. *Arthroscopy*, 2022, 38(2): 643-656.

- [14] Inoue S, Hatakeyama J, Aoki H, et al. Utilization of mechanical stress to treat osteoporosis: the effects of electrical stimulation, radial extracorporeal shock wave, and ultrasound on experimental osteoporosis in ovariectomized rats[J]. *Calcif Tissue Int*, 2021, 109(2): 215–229.
- [15] Inoue S, Hatakeyama J, Aoki H, et al. Effects of ultrasound, radial extracorporeal shock waves, and electrical stimulation on rat bone defect healing[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2021, 1497(1): 3–14.
- [16] Jorgensen JE, Larsen P, Elsoe R, et al. Callus formation and bone remodeling in a tibial nonunion after minimal invasive percutaneous screw fixation followed by extracorporeal shockwave therapy 17-months after initial trauma-A case report[J]. *Physiother Theory Pract*, 2022, 13: 1–13.
- [17] Kobayashi M, Chijimatsu R, Yoshikawa H, et al. Extracorporeal shock wave therapy accelerates endochondral ossification and fracture healing in a rat femur delayed-union model[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 530(4): 632–637.
- [18] Logan NJ, Camman M, Williams G, et al. Demethylation of ITGAV accelerates osteogenic differentiation in a blast-induced heterotopic ossification in vitro cell culture model[J]. *Bone*, 2018, 117: 149–160.
- [19] Lu CC, Chou SH, Shen PC, et al. Extracorporeal shock wave promotes activation of anterior cruciate ligament remnant cells and their paracrine regulation of bone marrow stromal cells' proliferation, migration, collagen synthesis, and differentiation[J]. *Bone Joint Res*, 2020, 9(8): 458–468.
- [20] Mei J, Pang L, Jiang Z. The effect of extracorporeal shock wave on osteonecrosis of femoral head: a systematic review and meta-analysis[J]. *Phys Sportsmed*, 2022, 50(4): 280–288.

(本文编辑:赵丽洁)