

- mass associated with physical activity may result in fewer fragility fractures in elderly men [J]. *J Bone Miner Res*, 2003,18(Suppl 2):S85.
- [43] Engelke K, Kemmler W, Weineck J, et al. EFOPS - 2 year results of a 3 year high impact exercise study for early postmenopausal women[J]. *Osteoporos Int*, 2002,13(Suppl 1): S21.
- [44] Samelson EJ, Cupples LA, Hannan MT, et al. Lifestyle, clinical factors & long-term risk for hip fracture in women & men: 50 years of follow-up from the framingham study [J]. *J Bone Miner Res*, 2003 ,18(Suppl 2):S16.
- [45] McLellan AR, Fraser M, Gallacher SJ, et al. The influence of socioeconomic deprivation on the incidence of fractures & on the uptake of post-fracture osteoporosis assessment by a fracture liaison service[J]. *J Bone Miner Res*, 2003 ,18(Suppl 2):S245.
- [46] Hannan MT, Tucker KL, Dawson-Hughes B, et al. Low calcium intake magnifies the bone loss seen with low dietary protein intake in elderly men and women [J]. *J Bone Miner Res*, 2003 ,18(Suppl 2):S240.
- [47] Finigan J, Greenfield DM, Blumsohn A, et al. Frailty, debility and poor health predict vertebral fractures but not non-vertebral fractures[J]. *J Bone Miner Res*, 2003 ,18(Suppl 2): S84.
- [48] The National Osteoporosis Foundation. Osteoporosis: review of the evidence for prevention, diagnosis and treatment and cost effectiveness analysis. The basis for a guideline for the medical management of osteoporosis[J]. *Osteoporosis Int*, 1998, 8(Suppl. 4): S1-S88.

· 综述 ·

一氧化氮在冲击波促进成骨及抗感染过程中的作用*

翟磊¹ 邢更彦²

冲击波(shock wave, SW)是一种具有剧增高压和高速传导特性的爆破性声波,它能够通过适当的发生器传至特定的目标,能量密度一般在0.003—0.890mJ/mm²。体外冲击波(extracorporeal shock wave, ESW)首先在20世纪80年代被用于治疗肾及输尿管结石^[1]。在最近十多年期间,该项新兴技术由于其非侵入性和易操作性已经成功地被欧美国家广泛应用于骨不连^[2]、肩部的肌腱炎^[3-4]、肱骨内上髁炎^[5]、跖筋膜炎^[6]、股骨头缺血性坏死^[7]等顽固性骨肌疾病的治疗,并取得了满意疗效。目前有关ESW的机制为国内外研究热点,主要集中在以下两方面:骨组织疾病-促进成骨;软组织慢性损伤性疾病-抗感染作用。本文就一氧化氮(nitric oxide, NO)在冲击波促进成骨及抗感染过程中的作用及其分子机制做一综述。

1 NO与一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)

NO是由体内L-精氨酸(L-arginine),在黄素腺嘌呤二核苷酸、黄素单核苷酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸、四氢叶酸和血红素(铁原卟啉IX)等辅基存在的条件下,在NOS的作用下,其末端氨基原子氧化而成。NO具有许多生物学活性,如抑制血小板聚集、黏附、抑制血管平滑肌增生、调节血管张力、稳定血液循环容积、介导细胞免疫和细胞毒作用等。其作为一种新型气体信使,既具有第一信使又有第二信使特性,可以激活胞浆内游离的鸟苷酸环化酶,作用于蛋白激酶G, cGMP调控的离子通道和cGMP调节的磷酸二酯酶,导致不同的生物效应^[7-8]。

迄今为止所分离到的NOS亚型可分为两大类:构成型(constitutive nitric oxide synthase, cNOS)和诱导型(inducible nitric oxide synthase, iNOS)^[9]。cNOS可因其最初来源于神经和内皮细胞,再分为内皮细胞型(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和神经型(neuronal nitric oxide synthase, nNOS),酶活性依赖钙调节蛋白(Ca²⁺/CaM),正常体内cNOS只有少量表达,当各种刺激因素引起细胞内Ca²⁺浓度升高时, Ca²⁺与CaM结合,形成Ca²⁺/CaM复合物,刺激cNOS产生少量NO,

行使正常的生理功能,如血管舒张,神经传导。eNOS在内皮细胞及其相关细胞中与其他蛋白质紧密地接触而存在。任何条件的改变都可能导致eNOS产生的NO量的改变,eNOS主要在丝氨酸残基上被磷酸化,较少在苏氨酸和酪氨酸残基上发生。通过磷酸肌醇-3激酶和蛋白质激酶B使丝氨酸磷酸化是当前的一热门课题^[9],其导致eNOS活性改变。eNOS活性不只通过酶磷酸化而且也可以与其他蛋白质相互作用而产生影响,例如钙调蛋白,小窝蛋白(caveolin)1-3和热休克蛋白90(Hsp90)^[10-11]。nNOS基因位于染色体12q24.2,含有28个外显子,长达100kb,巨噬细胞iNOS基因为37kb,含有26个外显子,位于17cen-q11.2区,eNOS基因位于7q35-36,含有26个外显子,长度为21kb。巨噬细胞iNOS基因启动子的调控已清楚,巨噬细胞iNOS基因转录起始点上游30个碱基处含有一个TATA盒,其上游有脂多糖(LPS)相关反应元件和干扰素(IFN)相关的转录因子结合序列前者包括与转录因子(NF-IL-6和NF-κB)结合的位点,LPS诱导的巨噬细胞iNOS基因的表达可能与这些位点的激活有关。IFN相关的转录因子的结合序列本身的活化并不引起巨噬细胞iNOS基因的表达,但IFN协调LPS诱导iNOS基因表达的作用与该区域的激活有关。这提示IFN和LPS协同作用引起巨噬细胞NOS基因的高表达的分子机制,也从转录水平阐明了IFN增强LPS的炎症反应的机制。iNOS是Ca²⁺/CaM非依赖性。用LPS和不同细胞因子,如干扰素-γ(IFN-γ),白介素(IL-1b)和TNF-α,刺激后可以在所有类型细胞中表达。iNOS表达诱导发生在转录水平,也可通过一些核转录因子(NF-κB)的

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371430);首都医学发展科研基金资助项目(2002—3037)

1 武警总医院关节四肢外科,北京市海淀区永定路69号,100039

2 通讯作者:邢更彦(武警总医院骨科,北京市海淀区永定路69号,100039, jstzzl2000@yahoo.com.cn)

作者简介:翟磊,男,硕士研究生

收稿日期:2006-09-04

早期活化来进行调节。NF- κ B活性的抑制可能会连续下调在炎症反应中起重要作用的基因的表达(包括iNOS)^[12-13]。

2 NO在ESW促进成骨过程中的作用

多数研究发现^[14-15]:骨组织中的血管内皮细胞存在NO介导的自我调节机制。NO主要通过增加血管平滑肌内cGMP水平,是骨折部位的血管扩张来增加骨折端血流量,同时NO也调节骨髓的血液供应,加速血细胞的生成。Corbett等^[16]在断裂的骨组织匀浆中发现eNOS的表达明显上调,同时骨折愈合早期局部血流的变化与皮质骨内正常血管的eNOS含量增加有关,这种NO依赖性的血管反应符合骨折修复过程中的自然愈合模式。当给实验动物服用NO竞争性抑制剂L-硝基-精氨酸甲基酯(L-nitro-arginomethyl ester, L-NAME)时,发现骨折局部及患肢血管阻力增加,循环血流量呈剂量依赖性减少,提示NO的血运调节作用不容忽视。

在机械应力的作用下,成骨细胞培养体系中NO的生成速率明显加快,20min时即可达到浓度高峰,在与对照组相比其产量增加了2.5倍以上,随后NO浓度迅速回落至正常水平,说明决定成骨细胞生成NO的调节因素与应力刺激有关^[17]。Fox等^[18]认为,应力刺激骨折愈合的信号转导途径是通过NO实现的,NO抑制剂能明显妨碍应力诱导下的骨形成。机械应力可提高成骨细胞和骨细胞中NOS的活性,使前列腺素含量升高,从而抑制骨吸收。可见,骨细胞、骨基质和细胞外液对应力刺激的及时响应及功能适应使体内形成了复杂的自身反馈调节系统。

ESW可以增强那些与血管再生有关的缺氧诱导因子(HIF)-1 α 、血管内皮生长因子(VEGF)-A、eNOS表达水平,促进新血管的再生和骨肌系统损伤的修复^[19]。Wang等^[20]以最佳剂量为0.16mJ/mm²,500Hz的ESW刺激BMSC,1h后O²⁻、NO₃⁻明显增高,而NO的含量却降低;当加入过氧化物酶清除O²⁻,将NO水平升至正常后,ESW促进成骨母细胞生长和成熟的作用受到了抑制,然而,用尿酸盐抑制NO₃⁻或用L-NAME抑制NO,均不会影响ESW诱导成骨的作用,这表明可能是ESW刺激成骨过程中的早期信号。而且,ESW可能调节细胞的氧化-还原反应和影响以NO为信使、NADPH还原酶为电子供体的cGMP信号转导^[19]。Wang等^[21-22]应用NADPH氧化酶阻断法证实:ESW作用后成骨细胞Ras蛋白诱导、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)依赖的HIF-1 α 和VEGF-A分泌水平增高;动物实验也证实ESWT可以促进骨骼肌腱连接部位新生血管的生成及相关抗原标记因子VEGF-A和eNOS的表达。

3 NO在ESW抗炎过程中的作用

NO在炎症反应过程中具有双向作用,既具有细胞保护作用,也有细胞毒作用^[8]。研究表明NO通过巨噬细胞下调淋巴细胞免疫应答,抑制T淋巴细胞的增殖,发挥细胞间信号传递作用。在某些感染性疾病的发病过程中,可以检测到iNOS活性增加,其合成的NO可以防止发生过强过久的免疫反应,这是由于NO具有细胞内或细胞间信息分子的功能,防止自身免疫反应。Hopkins^[23]在研究NO浓度对慢性铜绿假单

胞杆菌肺部感染动物模型的影响过程中,首次证实对于慢性铜绿假单胞杆菌肺部感染,增加内皮型NO的产量具有抗炎作用,相反减少内皮型NO的产量则会加重炎症反应。Larsson^[24]通过研究NO对末梢肺组织的影响,证实NO是通过抑制气道组织细胞炎性介质的释放,起到抗炎作用,而不是直接松弛气道平滑肌而起作用。

近年来研究表明^[25],物理力(例如剪切力)可以导致受作用细胞的骨架结构发生极大的改变以及磷酸化后eNOS活性的提高。由于低能量ESW可引发一个类似的剪切力,因此ESW治疗就可能引发eNOS和其他蛋白相互作用,从而导致其活性的激活,产生NO,介导NO-cGMP信号通路。已有研究证明^[26],ESW可以使受作用组织内新生血管形成,将ESW作用于狗的肌腱止点部位,4—8周后观察到肌腱内有新生血管形成,表明ESW作用肌腱组织可诱导产生新生血管内皮细胞。在肌腱愈合过程中,腱细胞表达eNOS,而抑制eNOS活性,则阻碍肌腱愈合,表明eNOS在肌腱损伤过程中起重要作用^[26-27]。在人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中,eNOS活性被酪氨酸和丝氨酸磷酸化调节^[28]。Marrionto等^[29]用HUVEC作为模型,观测到以低能量密度ESW干预可以在常态或炎症的情况下增加HUVEC中NO产量,迅速提高细胞中eNOS活性,其是通过调节从本身磷酸化状态转移到一个比较少的酪氨酸-磷酸化状态这样的一个平衡,没有影响到其他的丝氨酸磷酸化,由此可以解释酶活性迅速增高的原因。LPS/IFN- γ 干预HUVEC后导致eNOS活性迅速抑制和相关的NF- κ B的活化,而ESW使eNOS活性维持在基础水平,eNOS产生的NO可以有效地拮抗NF- κ B的活性且减弱炎症效应。因此,Marrionto S推断临床上所观察到的ESW抗感染作用的分子机制应当包括eNOS酪氨酸脱磷酸、NO产量的持续增加和NF- κ B活性的抑制。Ciampa等^[30]观察到低能量密度的ESW作用于大鼠神经胶质瘤细胞株C6时,可以快速增加其常态下nNOS和基础NO产量,而且能够恢复由LPS,IFN- γ 和TNF- α 组成的混合物所引起的nNOS活性和NO产量的降低。并且进一步证实ESWT能够有效的下调NF- κ B活性和NF- κ B相关基因的表达(如iNOS和TNF- α),从而降低eNOS活性,使整个炎症过程显著减少。然而,进一步研究这种机制需要在活体内进行。

4 小结

NO作为一种具有多种生物学效应的细胞调节因子,在骨肌疾病的各个阶段有不同的种类和水平的表达,并双向调节成骨与抗感染过程。ESW作为一种细胞外物理信号,可在组织细胞表面产生拉应力及压应力,进而介导一系列细胞内外“应力-化学”信号转导,从而调控相关基因表达,产生或减少有关活性蛋白,最终起到治疗作用。然而,目前关于NO与体外冲击波成骨与抗炎方面的研究尚少,其调节冲击波成骨和抗感染的具体机制尚未得到证实。当然NO也只是参与调节体外冲击波成骨与抗炎的因素之一,有关体外冲击波作用于骨肌系统后如何将细胞外的信号,通过跨膜信号转导,介导为胞内信号,经分子级联诱导调节基因表达,从而控制细胞的分化、增殖、发育等还有待更深入地了解。

参考文献

- [1] Ogden JA, Alvarez RG, Levitt R, et al. Shock wave therapy in musculoskeletal disorders (review)[J]. Clin Orthop, 2001, 387: 22—40.
- [2] Babhulkar S, Pande K, Batten J, et al. Nonunion of the diaphysis of long bones [J]. Clin Orthop Relat Res, 2005, 431: 50—56.
- [3] Rompe D, Zoellner J, Nafe B. Shock wave therapy versus conventional surgery in the treatment of calcifying tendonitis of the shoulder[J]. Clin Orthop, 2001, 387:72—82.
- [4] Pan PJ, Chou CL, Chiou HJ, et al. Extracorporeal shock wave therapy for chronic calcific tendinitis of the shoulders: a functional and sonographic study[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2003, 84(7): 988—993.
- [5] Theodore GH, Buch M, Amendola A, et al. Extracorporeal shock wave therapy for the treatment of plantar fasciitis[J]. Foot Ankle Int, 2004, 25(5): 290—297.
- [6] Ludwig J, Lauber S, Lauer HJ, et al. High energy Extracorporeal shock wave therapy of femoral head necrosis in adults [J]. Clin Orthop, 2001,387: 119—126.
- [7] Mariotto S, Menegazzi M, Suzuki H. Biochemical aspects of nitric oxide[J]. Curr Pharm Des, 2004, 10: 1627—1645.
- [8] Colasanti M, Suzuki H. The dual personality of NO [J]. Trends Pharmacol Sci, 2001,21:249—252.
- [9] Papapertropoulos A, Fulton D, Lin MI, et al. Vanadate is a potent activator of endothelial nitric oxide synthase: Evidence for the role of the serine/threonine kinase Akt and the 90-kDa heat shock protein [J]. Mol Pharmacol, 2004, 65: 407—415.
- [10] Fostermann U, Pollock JS, Schmidt HH, et al. Calmodulin-dependent endothelium derived relaxing factor/nitric oxide activity is present in particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelium[J]. Pro Natl Sci USA, 1991, 88:1788—1792.
- [11] Garcia GC, Fan R, Stern DF, et al. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin[J]. J Biol Chem, 1996, 271:27237—27240.
- [12] Chang K, Lee SJ, Cheong I, et al. Nitric oxide suppresses inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting post-translational modification of IkappaB important transcription factor and therapeutic target[J]. J Clin Phar, 2004, 38: 981—993.
- [13] Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine [J]. Crit Care Med, 2003,31: 105—111.
- [14] Stahl BE, Caduff RF, Greutert H, et al. Endothelial and smooth muscle cell dysfunction in human atherosclerotic arterial: implications for coronary artery bypass grafting [J]. J Card Phar, 2004,43:222—226.
- [15] Tanner FC, Largiader T, Greutert H, et al. Nitric oxide synthase gene transfer inhibits biological features of bypass graft disease in the human saphenous vein [J]. J Thor Card Surg, 2004,127:20—26.
- [16] Corbett SA, Hukkanen M, Batten J, et al. Nitric oxide in fracture repair: differential localization expression and activity of nitric oxide synthases [J]. J Bone Joint Surg (Br), 1999,81: 531—537.
- [17] Hukkanen M, Hughes FJ, BATTERY LD, et al. Cytokine-stimulated expression of inducible nitric oxide synthase by mouse, rat and human osteoblast-like cell and its functional role in osteoblast metabolic activity [J]. Endocrinology, 1995, 136: 5445—5453.
- [18] Fox SW, Chow JW. Nitric oxide synthase expression in bone cells[J]. Bone, 1998, 23:1—6.
- [19] Wang CJ, Wang FS, Yang KD, et al. Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction: A study in the rabbits[J]. J Orthop Res, 2003, 21: 984—998.
- [20] Wang FS, Wang CJ, Huang HJ, et al. Physical shock wave mediates membrane hyperpolarization and Ras activation for osteogenesis in human bone marrow stromal cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 287(3): 648—655.
- [21] Venturini G, Colasanti M, Persichini T, et al. Beta-amyloid inhibits NOS activity by subtracting NADPH availability[J]. FASEB J, 2002, 16:1970—1972.
- [22] Chen YJ, Kuo YR, Yang KD, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 kinase in shock wave-promoted bone formation of segmental defect in rats [J]. Bone, 2004, 34(3): 466—477.
- [23] Hopkins N, Gunning Y, O'croinin D, et al. Anti-inflammatory effect of augmented nitric oxide production in chronic lung infection[J]. J Pathol, 2006 (Epub ahead of print).
- [24] Larsson AK, Back M, Hjoberg J, et al. Inhibition of nitric-oxide synthase enhances antigen-induced contractions and increases release of cysteinyl-leukotrienes in guinea pig lung parenchyma: nitric oxide as a protective factor[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005,315(1): 458—465.
- [25] Davies PF, Zilberberg J, Helmke BP. Spatial microstimuli in endothelial mechanosignaling [J]. Circ Res, 2003, 92: 359—370.
- [26] Wang CJ, Huang HY, Pai CH. Shock wave enhanced neovascularization at the tendon-bone junction: An experiment in dogs[J]. J Foot Ankle Surg, 2002,41:16—22.
- [27] Lin J, Wang MX, Wei A, et al. The cell specific temporal expression of nitric oxide synthase isoforms during tendon healing[J]. Achilles Inflamm Res, 2001, 50: 515—522
- [28] Gotte G, Amelio E, Russo S, et al. Short-time non-enzymatic nitric oxide synthesis from L-arginine and hydrogen peroxide induced by shock waves treatment [J]. Federation of European Biochemical Societies Letters, 2002, 520: 153—155.
- [29] Mariotto S, Cavalieri E, Amelio E, et al. Extracorporeal shock waves: from lithotripsy to anti-inflammatory action by NO production[J]. Nitric Oxide, 2005,12: 89—96.
- [30] Ciampa AR, Prati A, Amelio E, Cavalieri E, et al. Nitric oxide mediates anti-inflammatory action of extracorporeal shock waves[J]. Federation of European Biochemical Societies Letters, 2005, 579: 6839—6845.

· 综述 ·

纯失读症研究进展

俞厚明¹ 翁旭初² 罗本燕^{1,3}

阅读是人类信息交流的重要方式^[1]。由于后天大脑损伤导致的阅读障碍,称为获得性阅读障碍。根据阅读障碍所表现的语言学特点,失读症可分为表层失读症、语音性失读症、深部失读症及纯失读症。表层失读症是由于词汇通路加工受损,患者过度利用形素音素转换(grapheme to phoneme correspondence, GPC)非词汇通路,从而在阅读时表现出特征性

1 浙江大学医学院附属第一医院神经内科,杭州,310003

2 中国科学院心理所脑高级功能实验室

3 通讯作者:罗本燕(浙江大学医学院附属第一医院神经内科,杭州,310003)

作者简介:俞厚明,男,硕士

收稿日期:2006-09-26