

DOI: 10.13376/j.cbls/2021014

文章编号: 1004-0374(2021)01-0121-10

· 技术与应用 ·

促进骨折愈合的治疗策略及机制研究进展

王小璐, 崔宇*, 张令强*

(军事科学院军事医学研究院生命组学研究所, 北京 100850)

摘要: 骨折愈合和修复是一个复杂的过程, 包括膜内成骨和软骨内成骨两种方式。绝大多数骨折患者经治疗后可以愈合, 但由于术后感染、患者自身成骨能力差等原因, 仍有5%~10%的骨不连患者无法愈合进而导致截肢等风险。目前骨不连的治疗包括自体骨移植、使用重组生长因子BMP等策略, 但尚无获得批准的治疗药物, 因此还需对骨折愈合过程中的生物学机制进行深入研究, 寻找其他低风险、高治愈效率的替代疗法。该综述简要介绍了骨损伤后骨折修复和再生的生物学过程, 总结了目前临床上用于促进骨折愈合的方法, 并对促进骨折愈合的重要分子机制及作用靶点等进行了归纳和总结。

关键词: 骨折愈合; 临床治疗; 分子机制; 潜在靶点

中图分类号: R318; R683 **文献标志码:** A

Research progress on therapeutic strategies and potential mechanisms to bone fracture healing

WANG Xiao-Lu, CUI Yu*, ZHANG Ling-Qiang*

(Institute of Lifeomics, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Fracture healing and repair is a complex process via intramembranous and endochondral ossification. Clinically, the vast majority of fracture patients could reach union. However, there are still 5%~10% of nonunion patients who cannot reach union or even face the risk of amputation due to postoperative infection and poor ability of osteogenesis after bone fracture. The current treatments of nonunion include autologous bone transplantation, recombinant growth factor BMP and other strategies. Up to now, no drugs have been approved by FDA for treating nonunion or promoting fracture healing. Therefore, it is necessary to conduct in-depth research to uncover underlying molecular mechanisms of fracture healing, and to find other low-risk, high-efficiency alternative treatments. This review briefly introduces the biological process of fracture repair and regeneration after bone injury, summarizes the current clinical methods for promoting fracture healing, and wraps up the important signaling pathways and targets that could potentially promote fracture healing.

Key words: fracture healing; clinical treatment; molecular mechanism; potential targets

骨折的修复以及再生是一个复杂的生物学过程, 随着近几十年医学技术的不断提高, 绝大多数骨折患者经治疗后均可以恢复到正常状态, 但仍有一部分患者无法愈合, 落下终身残疾。骨折不仅给社会带来巨大的经济损失, 同时长期的骨折无法愈合也给患者带来精神方面的压力。研究表明, 长期骨不连的女性患者患抑郁症的可能性更大^[1]。目前临床上骨折治疗手段多偏重于骨移植等手术方法, 促进骨愈合的药物开发及临床批准应用较少, 对骨

不连患者的治疗方案有限。因此, 需要对骨折修复的生理过程有更深入的了解, 以揭示更多潜在的骨折愈合治疗靶点, 并不断开发、改进药物及修复材料递送体系, 寻求更加有效、副作用更小、更经济的骨折愈合治疗方式。

收稿日期: 2020-06-24; 修回日期: 2020-10-16

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31800746)

*通信作者: E-mail: zhanglq@bmi.ac.cn (张令强);
cuiyubmi@163.com (崔宇)

1 骨折修复的生物学过程

正常情况下,骨折愈合分为血肿期、骨痂期(软骨痂和硬骨痂期)以及重建期。在骨头断裂初期,血管被破坏,软组织发生损伤,巨噬细胞和血小板释放细胞因子募集干细胞到骨折处,诱发血肿和炎症反应。炎症反应在受伤后24 h达到峰值,在7 d后基本消失。在此期间,破骨细胞也被募集,吸收断端处的骨碎片^[2]。在骨痂期,骨折线周围干细胞会逐渐分化为软骨细胞并形成软骨痂,血管被募集,长出愈伤组织,为合成代谢提供营养、生长因子以及破骨和成骨细胞等。骨折修复的干细胞来源之前被认为主要来自于骨髓间充质干细胞,其作用主要局限于骨髓腔。但近年的研究表明,骨膜表面也存在干细胞群体,称为骨膜干细胞,其在骨折修复过程中也发挥着重要作用^[3-4]。骨折修复过程主要包括膜内成骨和软骨内成骨两种方式,这两种成骨方式的发生与骨折断端的稳定性密切相关。在稳定性高的骨内膜和骨膜表面,干细胞可直接分化为成骨细胞,并通过膜内骨愈合促进骨折修复。在稳定性差、活动性较高的骨折缝隙中,干细胞则会分化为软骨细胞,形成柔软的软骨痂,在骨折断端间起到“临时桥梁”的作用^[5-6],这一过程称为软骨内成骨。长期以来,软骨内骨化过程中成骨细胞的来源一直存在争议。一种学说认为骨折后肥大软骨细胞发生凋亡,干细胞通过骨脉管系统进入软骨愈伤组织,生成骨组织以代替软骨。另一种学说则认为,肥大软骨细胞在生长板部位和骨再生的过程中可以不经历凋亡而直接转分化为成骨细胞,这一过程可能是由于肥大软骨细胞恢复了某些干细胞样功能而导致的,该学说被认为是软骨内成骨过程中成骨细胞产生的主要途径^[7-8]。随着骨折修复的进程加快,软骨骨痂不断被吸收,成骨细胞生成I型胶原蛋白并直接矿化成硬度低的编织骨。最后,骨折修复进入重建期,破骨细胞和成骨细胞活动循环耦合,骨髓腔得以重建,骨痂逐渐消失,皮质骨恢复到骨折前的形态和生物力学水平^[9]。

2 骨不连的定义和分类

骨折是否愈合主要基于影像学(桥接的愈伤组织、桥接的皮质的数量以及骨折线的消失)和临床因素(在负重活动过程中,骨折部位有无疼痛或压痛)进行评估。根据美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)的定义,某处骨折至少存在9个月,并且连续3个月未显示任何愈

合迹象即可称为骨不连^[10]。临床上,骨不连可分为肥大性和萎缩性两种类型。肥大性骨不连在X线片上表现为骨折部位骨痂较大,骨折间隙呈现较大的、变宽的愈伤组织,其区域具有射线可透性。肥大性骨不连具有很高的再生潜力,但由于机械稳定性不足和连续的过度动员等因素可能导致无法治愈。萎缩性骨不连主要表现为骨痂组织缺失、骨端变窄、骨折间隙呈现较大的射线可透区^[10]。萎缩性骨不连缺乏血管,没有足够的成骨反应,没有愈伤组织形成和愈合的迹象。

3 促进骨折愈合的临床治疗策略

目前临床上已经用于促进骨折愈合的方法主要包括骨移植、物理辅助性疗法、人源重组BMP因子的局部注射、全身注射甲状旁腺激素以及干细胞治疗等(表1)。

3.1 骨移植

临床绝大部分骨折类型为长骨骨折,无需手术即可修复,但也有一部分骨折存在临界尺寸的缺损(骨折断端处超过3 cm),必须通过手术干预才能愈合。研究数据表明,骨缺损的长骨骨折患者中有8%愈合延迟,17%最终发展为骨不连^[11]。对于较大的骨缺损,可以通过移植骨来治疗,目前临床常用的骨移植主要包括自体骨移植和同种异体骨移植。

自体骨移植是指将自身的松质或皮质骨组织从某一部位移植到另一部位。自体移植因植入物内含有丰富的活细胞及多种骨诱导因子、免疫原性和病毒传播风险低等优点,其成功率高达80%~90%,成为手术的金标准^[12]。另一方面,自体移植只能从非承重区域收获少量骨骼,并且当可用的供体组织由于细胞量少、纤维性胶原丰度低或有其他损伤而导致成骨潜力变差时,自体移植就有失败的风险^[13]。此外,移植时采集骨头会产生第二个手术部位,进而会延长手术时间并容易造成长时间的疼痛。

同种异体骨是自体骨的合适替代品,取自健康的他人而非自体,多用于自体骨量不足或存在骨质疾病的患者。异体骨来源丰富,容易加工,并且由于其多孔性质,骨传导性能较好。但由于其储存和移植需要灭菌,进而骨细胞活性降低,丧失成骨及骨诱导能力^[12],对长期骨不连患者的治愈率较低。据统计,同种异体移植术后头5年的失败率约为20%~25%,术后10年升高至60%^[14]。

3.2 物理辅助性疗法

物理辅助性疗法主要包括脉冲电磁场和低强度

表1 目前临床上用于治疗骨折的方法

治疗策略	治疗方式	治疗原理	治疗效果
骨移植	自体移植	将自身的松质或皮质骨组织从某一部位移植到另一部位	成功率高, 是手术的金标准
	同种异体移植	移植骨取自他人, 自身可分解, 新生骨最终取代植入骨的位置	是自体骨的合适替代品
物理治疗	脉冲电磁场(PEMF)	促进骨痂中血管生成与重塑, 促进机械信号转化为生物学信号	提高骨不连患者的治愈率
	低强度脉冲超声(LIPUS)		
药物治疗	局部注射人源重组BMP (rhBMP)	促进MSCs向成骨、软骨谱系分化; 促进软骨细胞肥大分化; 促进骨痂重塑	是治疗骨不连、脊柱融合和种植牙的最有效的生长因子
	全身注射甲状旁腺激素(PTH)	促进软骨细胞和成骨细胞增殖, 推迟软骨细胞肥大, 增强成骨与破骨细胞的耦连	降低骨折风险; 促进愈伤组织的形成, 减少愈合时间
干细胞治疗	骨髓间充质干细胞(BMSCs)	可迁移至损伤部位, 抑制炎症反应, 并与多种生长因子相互作用促进成骨细胞的分化	最常用的干细胞来源
	脐带间充质干细胞(HUC-MSCs)		已进入 I 期或 II 期临床, 骨再生的应用相对较少
	骨膜干细胞(PMSCs)		应用于骨不连、关节置换以及上颌窦底隆突等治疗

脉冲超声两种治疗手段。1953年, 日本科学家 Yasuda 首次报道了连续电流可在兔体内促进新骨形成^[15], 从而开辟了脉冲电磁场(pulsed electromagnetic field, PEMF)促进骨形成及骨骼愈合的研究领域。1971年, Brighton 小组首先将此技术应用于骨不连的治疗, 成功率达到77%^[16]。1979年, FDA 批准了PEMF疗法用于骨不连的治疗^[17]。但PEMF治疗缺乏直接、特异性的细胞因子及作用靶点, 相关文献所记录的结果也存在争议, 因此临床治疗中并未采取此类方法作为首要的辅助治疗手段^[18]。

1983年, 研究首次报道使用低强度脉冲超声(low intensity pulsed ultrasound, LIPUS)可加速人类骨折的修复^[19], 这种方式通常施加在骨折部位的皮肤上, 通过外部刺激来加速骨折损伤处的修复。FDA于1994年批准了基于该原理的低强度超声仪 EXOGEN™ 系统用于骨折的愈合治疗^[20]。研究发现, 每天使用LIPUS 20 min, 经3~6个月治疗后, 可有效减少骨折愈合的时间^[21]。在超过8个月的肥大性骨不连的患者中, LIPUS的治愈率高达84%^[22]。目前LIPUS治疗的安全性高, 且无侵入性损伤, 已经成为辅助治疗骨折不愈合的首选。但LIPUS也存在不足, 主要是其作用范围小(仅用于骨折间隙小于10 mm的具有稳定固定的不愈合患者), 且穿透深度浅(1~5 cm), 因此限制了其在临床上的应用场景^[23]。

3.3 人源重组BMP细胞因子的局部注射

目前, 人源重组BMP (recombinant human bone morphogenetic protein, rhBMP)是用于治疗骨不连、脊柱融合和种植牙愈合的最有效的生长因子^[24]。例如, FDA批准OP-1™(rhBMP-7)植入物可用于治疗后外侧腰椎融合及长骨骨不连, 批准INFUSE™ (rhBMP-2)胶原海绵移植物用于治疗胫骨开放性骨折和前腰椎脊柱融合^[25]。但由于rhBMP的递送使用往往超过生理剂量, 这不仅导致治疗费用高昂, 而且rhBMP的扩散也会导致异位骨形成、天然骨吸收及软组织肿胀和溶骨等不良作用, 因此在儿童、孕妇及肿瘤患者中rhBMP仍未获得批准使用^[26]。为降低过多使用BMP细胞因子的风险, 最新的研究多集中于BMP联合其他因子共同使用进而降低其使用剂量及副作用。例如, 已有研究将皮质类固醇如低剂量地塞米松等与BMP-2共同给药, 可显著减少软组织炎症和细胞侵袭^[27]。向BMP-2中添加NEMO结合域肽(NEMO binding domain peptide, NBD)可减少BMP-2诱导的软组织水肿和单核细胞浸润, 并可促进脊柱融合过程中的骨形成^[28]。将BMP-2与VEGF或FGF等生长因子共递送可显著促进骨形成^[29-30]。此外, 有研究将一种新型促骨形成蛋白Nel1型分子(NELL-1)与BMP-2共同使用也可协同促进成骨, 降低BMP的用量^[31]。

3.4 系统注射甲状旁腺激素

甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)是一种天然激素,其活性部位(氨基酸1—34)和全长分子(氨基酸1—84)可有效调节矿物质体内稳态。FDA已批准重组人甲状旁腺激素肽[rhPTH (1-34),也称为特立帕肽]用于治疗骨质疏松症,目前临床上也在利用特立帕肽来增强骨折愈合。临床证据表明,全身注射PTH能够促进愈伤组织的形成,减少愈合时间^[32]。阿波罗哌肽(abaloparatide)是甲状旁腺激素1型受体的选择性激活剂,一项随机临床试验表明:绝经后骨质疏松症妇女皮下注射阿波罗哌肽治疗可减少18个月内发生新的椎骨和非椎骨骨折的风险^[33]。但另有研究表明,连续高剂量注射PTH可引发分解代谢反应,不利于骨折的愈合及修复,因此要慎重用药。

3.5 干细胞治疗

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是具有多种来源的非造血干细胞,例如骨髓、骨膜、脂肪、肌肉、脐带血等。MSCs不仅具有迁移到损伤部位和抑制炎症反应的能力,还可以通过降低促凋亡因子(Bax、Caspase-3)的表达防止细胞死亡,因此MSCs被认为是组织修复的有效工具^[34]。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)是细胞治疗和组织修复中最常用的干细胞^[35]。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、基质细胞衍生因子1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1)、胰岛素样生长因子1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)等因子在调节MSCs分化为成骨细胞的过程中发挥着重要作用^[36]。2019年,欧洲一项多中心人类临床试验结果表明,在长骨假性关节炎和胫骨或肱骨不愈合患者中,将生物陶瓷颗粒与自体MSCs结合使用具有安全性^[37]。多项临床研究表明,移植MSCs能够促进骨不连患者的骨再生^[38]。尽管BMSCs是干细胞移植的最佳选择,但由于其抽取过程痛苦、骨髓抽吸物比例低、难以在体外扩增以及伴有致瘤的风险,近些年研究者将注意力集中在使用含有BMSCs分泌的内部细胞因子/介体的BMSC条件培养基(BMSC-CM)上,以开发无细胞治疗干细胞疗法。目前已有研究表明,BMSC-CM是牙周组织再生的替代疗法,因为BMSC-CM中包含了几种有助于伤口愈合和血管生成的细胞因子,如IGF-1、VEGF、TGF- β 1等^[39]。

脐带血也是干细胞的重要来源之一,世界各地

已经建立了脐带血库以满足日常临床需要。动物实验表明,脐带血间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, uMSCs)能够通过促血管生成间接促进骨形成^[40]。但是,由于造血谱系向其他谱系分化受到限制,uMSCs的分化能力远不如脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUC-MSCs)^[41]。与BMSCs相比,HUC-MSCs的优势在于:(1)来源广泛(可以从羊膜、脐带衬里、沃顿氏胶和血管周围区域获得);(2)收集过程具有非侵入性,可降低感染风险;(3)体外具有更高的增殖分化能力;(4)更重要的是其免疫原性更低,几乎不产生畸胎瘤。这些特点使HUC-MSCs拥有广阔的应用前景,并成为MSCs的主要来源。目前对HUC-MSCs进行的临床治疗试验大多已进行到I或II期,其中包括神经功能缺损、肝病、免疫系统疾病、糖尿病、肺损伤、肾损伤和急性白血病等,对于骨再生的应用相对较少^[42]。

骨膜作为高度血管化的组织,包括可以分化为成骨细胞或软骨细胞的骨祖细胞以及其他相关生物活性因子。研究表明,与BMSCs相比,骨膜细胞(perioosteal cells, PCs)具有更强的增殖、分化及克隆形成能力,因此它经常被用作骨或软骨组织工程的细胞来源^[4]。目前多种动物模型已经证明,利用支架将骨膜来源细胞(perioosteum-derived cells, PDCs)植入缺损处,可有效提高动物的骨再生能力^[42]。在临床应用中,骨膜干细胞(perioosteal mesenchymal stem cells, PMSCs)移植也已广泛应用于骨不连、关节置换以及上颌窦底隆突等治疗中。目前研究主要集中于人工骨膜的开发,即通过研究骨膜的宏观和微观结构以及仿生组织工程化骨膜的机械反应和血管生成以提高治疗效果,但仿生研究仍处于起步阶段,其材料选择、设计理念和性能评估还需改进,并且还要依靠可靠的体内模型以满足骨缺损治疗的临床需求。

截至2019年1月,已经有700多项临床试验将MSCs移植作为常规疗法的替代方案,以改善患者生活质量并延长生存期。尽管这些试验获得了令人鼓舞的结果,但MSCs治疗仍难以作为临床治疗的标准,因为对于不同适应症,MSCs的理想来源缺乏明确性,且缺乏标准化的分离、扩增、培养方案,其有效递送途径、最佳剂量的施用频率等还需更深入的研究^[34]。

尽管上述临床采用的治疗手段多数情况下可成功治愈骨折,但也存在风险高、术后并发症严重、

治疗价格昂贵及具有潜在副作用等问题。目前, 已有多项文献证明信号通路在骨折愈合和修复过程具有重要作用。因此, 深入研究相关的分子机制, 以提高骨折治愈率具有重要意义。下文将总结已在动物模型上得以验证具有促进骨修复的功能, 并在临床上被批准用于骨再生的重要分子以及信号通路。

4 促进骨折愈合的重要信号通路及分子机制

4.1 FGF信号通路

成纤维生长因子(fibroblast growth factor, FGF)是作用于间充质和神经外胚层来源细胞的有效促分裂剂, 同时也在多种细胞的分化中起作用, 并参与形态发生、血管生成和发育。FGF家族由23个基因编码而成, 其信号主要通过MAPK途径介导, 包括细胞外信号相关激酶1/2 (ERK1/2)、p38 MAPK、应激激活蛋白激酶/c-Jun N-末端激酶(SAPK/JNK)、蛋白激酶C (PKC)和磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)途径等^[43]。临床发现FGF及其受体的错义突变会引发多种先天的骨骼疾病, 包括软骨发育不良综合征、颅突综合征、磷酸盐代谢失调综合征等^[44], 提示其在骨形成及促进骨折修复中发挥重要作用。

Schmid等^[45]使用定量RT-PCR方法评估小鼠长骨骨折模型中FGF的时间表达模式, 结果发现FGF家族多位成员在骨折修复不同阶段的表达模式有明显变化。另外, FGF家族不同成员在不同细胞系及细胞愈合不同阶段发挥的作用也不尽相同。FGF-2是骨和软骨细胞功能的有效调节剂, 由成骨细胞产生, 积累在骨基质中, 并作为骨细胞的自分泌/旁分泌因子通过Ras/MAPK途径促进成骨细胞和软骨细胞的增殖、分化; 而且外源FGF-2同样具有药理作用, 目前已在多种模型中证明其可以有效促进骨折愈合^[43]。另外, FGF-2也被发现可促进骨吸收, 它通过诱导环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)和核因子- κ B配体受体(RANKL)的激活促进破骨细胞分化, 并参与类风湿关节炎患者的关节破坏^[45]。以上这些证据提示了FGF家族成员在骨折愈合过程中作用的多样性及时空特异性。

FGF尽管被证明可促进骨骼再生, 但其体内半衰期较短, 需要配以合适的载体递送来延长药物作用时间^[46]。另外, 药物的递送频率也是重要因素。已有研究表明, 连续使用FGF2/9处理会抑制成骨细胞的成骨和矿化作用, 而短暂预处理可显著增强矿化作用^[47]。

除了活化的FGF/FGFR可直接产生细胞信号

转导外, FGF还与其他途径(如BMP信号、Wnt/ β -catenin信号)相互作用, 调节成骨细胞生成。FGF2可通过促进RUNX2和磷酸化SMAD1/5/8的核定位来增强成骨细胞中经典BMP2信号的转导, 并抑制BMP拮抗剂Noggin的表达; 此外, 外源性FGF2可促进Fgf2^{-/-}小鼠中 β -catenin的积累并促进成骨细胞分化^[48]。

4.2 VEGF信号通路

骨骼是高度血管化的器官, 血管的生成在骨骼发育和修复中至关重要, 骨损伤后血管供应不足是萎缩性骨折的主要原因, 而VEGF是血管生成和发育过程中一种重要的调节剂, 因此有望成为促进骨折愈合的治疗靶点^[49]。

骨损伤后, 缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)促进受损周围骨细胞以及炎症细胞表达VEGF, 成骨细胞产生的VEGF也可通过CXCL12-CXCR4途径诱导中性粒细胞的趋化并提高内皮细胞活性, 促进血管生成^[50]。在软骨内骨化阶段, 成骨细胞和肥大性软骨细胞产生的VEGF可刺激破骨细胞生成, 加速软骨向硬骨组织的转化^[51]。VEGF还可以通过调节转录因子RUNX2和PPAR γ 2以及与核膜蛋白lamin A/C的相互作用, 控制间充质干细胞的分化, 从而决定细胞命运, 使其向成骨或成脂方向分化^[52]。

另外, 注射外源VEGF时应考虑生物体内源VEGF的含量。当内源VEGF水平正常时, 外源VEGF不会促进骨再生, 这有可能是因为局部高浓度的VEGF会刺激产生FLK1, 从而募集抑制性Smad7, 并减少内皮细胞中Smad2/3的活化, 以抑制成骨细胞成熟^[53]。局部递送VEGF或与BMP共递送可增强愈合反应, 但VEGF可在多种类型的细胞中竞争性阻断血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)的活化及其信号转导^[54], 阻碍周细胞成熟, 形成未成熟的血管^[55]。因此, VEGF与不同细胞因子或通路的相互作用可能会因修复区域(例如骨髓与骨膜)或修复机制类型(例如膜内骨化与软骨内骨化)的不同而存在差异, 靶向VEGF以促进骨折愈合的效应还需要更多动物实验数据的支撑。

4.3 PDGF信号通路

PDGF是由多种细胞合成, 并通过二硫键连接而成的多肽二聚体, 其通过自分泌和旁分泌机制直接作用于成骨细胞、破骨细胞, 促进细胞增殖; 也可通过刺激其他细胞(如巨噬细胞)和其他因子(如

IGF-1、IGF-2、TGF- β 和FGF)间接促进器官发生和伤口愈合^[56]。目前已在大鼠、比格犬等多种模型中证明局部注射PDGF能促进骨再生^[57-58]。在患有糖尿病的大鼠骨缺损模型中,局部注射人源重组的同源二聚体PDGF-BB (rhPDGF-BB)可促进早期细胞增殖,促进骨形成,这为糖尿病患者的骨折愈合治疗提供了新思路^[58]。

在临床研究中, FDA已批准rhPDGF用于治疗糖尿病性溃疡和牙周缺损^[59]。FDA于2015年批准了在脚踝和后足融合物中使用rhPDGF-BB/TCP胶原蛋白,并于2018年将其扩展为可注射形式^[60]。此外, PDGF-BB已在新西兰和加拿大获得当地监管部门批准,用于治疗骨修复,但FDA尚未批准其在骨折修复上的使用^[61]。

4.4 IGF信号通路

IGF信号通路是参与成骨细胞增殖和分化的重要信号通路,其家族成员IGF1和IGF2在与受体结合后,激活细胞质内激酶结构域并发生磷酸化,通过与对接蛋白,如与胰岛素受体底物1 (IRS-1)的相互作用刺激下游信号转导。IGF信号能诱导成骨细胞分化、刺激骨基质沉积,并能促进二型胶原的合成,抑制软骨退化^[62-63]。在小鼠、猪等多种动物模型中局部递送IGF-I可以促进愈合^[64],但敲除小鼠骨细胞中的IGF-1却可以促进骨折间隙的愈合,原因可能是BMP-2和Wnt信号的上调补偿了IGF-1的缺失效应^[65]。临床研究表明,骨不连患者血清中的IGF-I浓度比正常骨折愈合患者的要低^[66-67]。在临床实验中,将重组人IGF-I/IGF结合蛋白3复合物(rhIGF-1/IGFBP-3)局部注射于髌部骨折患者后展现出一定的有效性及安全性^[68],这表明IGF-1有望作为治疗骨不连的靶点,但其潜在的治疗作用还需进一步研究。

4.5 Notch信号通路

Notch信号通路高度进化保守,参与细胞存活、增殖、分化以及体内稳态调节等重要生理活动。当Notch受体及其配体相互作用时,其胞内结构域(Notch intracellular domain, NICD)被释放后转移至细胞核中以激活靶基因的转录^[69]。

基于多种小鼠模型的研究表明,抑制骨祖细胞中的Notch信号通路会使骨髓MSCs库耗竭,导致青春期小鼠骨量大但却产生年龄依赖性骨丢失^[70]。小鼠模型中条件性敲除骨祖细胞中的RBPJK分子以抑制Notch信号转导,将导致小鼠骨折不愈合^[71]。此外有研究表明,Notch配体Jagged1是骨折修复过程

中上调程度最高的配体, Jagged1可通过激活Notch信号通路促进骨折愈合过程中编织骨的形成,临床上Jagged1的功能突变会降低骨量并增加骨折风险^[72]。这些证据表明,Notch信号通路,尤其是Jagged1,可作为促进骨折愈合的潜在靶标。

4.6 Wnt/ β -catenin信号通路

Wnt是分泌性糖蛋白,可以与卷曲蛋白(Frizzled, FZD)、Ror2和Ryk等膜受体结合,产生细胞内信号并转导级联反应。当Wnt与细胞表面7次跨膜FZD结合时,可通过募集LRP5/6稳定复合物,使细胞质中的 β -catenin易位进入细胞核,与转录因子Tcf7和Lef1结合启动成骨基因表达^[73]。研究表明, β -catenin和Tcf7复合物在小鼠以及人类的整个骨愈合过程中均具有活性,并且在骨折愈合过程中发挥了不同的作用;在小鼠成骨细胞中激活 β -catenin,可增强其骨折愈合能力^[74]。2010年, Minear等^[75]将纯化的Wnt3a包装在脂质体囊泡中递送至骨缺损处,可有效刺激骨祖细胞增殖,并加速其分化为成骨细胞,促进骨折愈合。

糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)是Wnt信号通路的重要负调节分子,通过抑制GSK-3 β 可使细胞内 β -catenin增加,从而促进成骨细胞分化和骨愈合。目前临床上已对GSK-3 β 小分子抑制剂603281-31-8 (Eli Lilly)和AZD2858 (AstraZeneca)开展测试,结果显示这些化合物可增加成骨细胞的活性并促进骨折愈合^[76]。另外有研究表明, LiCl作为GSK-3 β 抑制剂,不仅可挽救Lrp5^{-/-}小鼠的低骨量表型,还可加速骨折修复^[77-78]。但值得注意的是,这种促进作用只发生在骨折愈合后期,在骨折前给药将会导致骨不连^[79]。

硬化蛋白(Sclerostin, Sost)和Dickkopf相关蛋白1 (Dkk1)也是Wnt信号通路的重要拮抗分子,二者通过直接结合Lrp5/6抑制成骨细胞。在多种骨缺损和骨折模型中,注射Sost或Dkk1抗体均可增强骨再生,促进骨折愈合^[80-81]。在啮齿动物和非人灵长类动物模型中同时抑制Sost和Dkk1可协同促进骨形成,与单一疗法相比,这种双特异性抗体显示出更强的骨修复能力^[82]。分泌的卷曲相关蛋白(Sfrp)也被认为是Wnt通路的拮抗剂^[83]。Moore等^[84]研究发现, *Sfrp1*基因敲除小鼠的骨折愈合修复能力相较野生型小鼠更强,骨骼机械强度也更高。另外,靶向Sfrp1的小分子抑制剂可有效刺激离体骨形成^[85],而且Sfrp1抗体可抑制炎症引起的牙周骨丢失,但针对Sfrp1的疗法目前尚未在骨折模型中进行测试^[86]。

从上述阐述中可以看到, 目前骨再生环境中靶向Wnt/ β -catenin途径的干预策略主要集中在中和或抑制Wnt信号通路的重要负向调节因子, 尤其是GSK-3 β 、Dkk、Sfrp和Sost等。通过添加Wnts因子作为激动剂的替代策略难以实现, 主要是因为Wnts因子只有在棕榈酰化后才具有活性, 而这一过程会导致其纯化困难并且费用昂贵, 另外如果剂量控制不当还会有致瘤性等潜在副作用^[87]。上述因素限制了Wnt通路激动剂在成骨及骨折愈合中的使用。

5 总结与展望

手术移植是治疗骨不连的金标准, 但其带来的并发症仍会导致患者无法愈合, 因此仍然需要不断开发新型的、更有效的手段, 以提高骨不连的治愈率, 减轻患者的痛苦, 降低治疗成本。目前骨移植相关的研究热点包括: 开发和优化新型的移植材料, 如结合3D打印技术, 开发更为精细的纳米级移植植物; 开发新型复合材料, 以提高成骨分化、血管生成和骨再生的能力等^[86]。

生长因子在骨折愈合过程中发挥重要作用, 但由于其在不同细胞、不同愈合阶段均可能产生不同的作用效果, 因此生长因子的递送剂量、方式以及频率还需不断优化。这一过程需要与生物组织工程相结合, 开发出更合适的局部递送系统, 如利用聚天冬氨酸(PASP)肽、(AspSerSer)₆寡肽等提高递送药物的靶向性; 开发新型支架, 如利用电化学、pH和紫外线作为触发剂以延长药物的持续释放时间, 调节释放速率等^[87]。

在骨折愈合的机制研究方面, 目前发现促进骨再生的信号通路多集中在促进骨折断端处MSCs的增殖或促进其成骨分化等方面, 对于软骨谱系的研究较少。另外, 针对上述分子或靶点, 除了在细胞等体外体系进行研究外, 还需在不同转基因动物模型、不同骨折损伤模型上对其作用进行确证。转基因动物模型需要包括不同细胞谱系的条件性基因敲除模型, 以确证潜在靶点分子在不同细胞或不同愈合阶段的作用。骨折损伤模型还应考虑动物的种类、骨折类型以及动物的生理状况等, 这些因素都会对骨折愈合产生一定影响。

[参 考 文 献]

- [1] Williams LJ, Berk M, Henry MJ, et al. Depression following fracture in women: a study of age-matched cohorts. *BMJ Open*, 2014, 4: e004226
- [2] Kolar P, Gaber T, Perka C, et al. Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *Clin Orthop Relat Res*, 2011, 469: 3118-26
- [3] Ortinau LC, Wang H, Lei K, et al. Identification of functionally distinct Mx1⁺ α SMA⁺ periosteal skeletal stem cells. *Cell Stem Cell*, 2019, 25: 784-96.e5
- [4] Duchamp de Lageneste O, Julien A, Abou-Khalil R, et al. Periosteum contains skeletal stem cells with high bone regenerative potential controlled by Periostin. *Nat Commun*, 2018, 9: 773
- [5] Colnot C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J Bone Miner Res*, 2009, 24: 274-82
- [6] Hu DP, Ferro F, Yang F, et al. Cartilage to bone transformation during fracture healing is coordinated by the invading vasculature and induction of the core pluripotency genes. *Development*, 2017, 144: 221-34
- [7] Yang L, Tsang KY, Tang HC, et al. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 12097-102
- [8] Zhou X, von der Mark K, Henry S, et al. Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004820
- [9] Andrzejewski P, Giannoudis PV. The 'diamond concept' for long bone non-union management. *J Orthop Traumatol*, 2019, 20: 21
- [10] Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, et al. Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury*, 2014, 45 Suppl 2: S3-7
- [11] Tzioupis C, Giannoudis PV. Prevalence of long-bone non-unions. *Injury*, 2007, 38 Suppl 2: S3-9
- [12] Fillingham Y, Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. *Bone Joint J*, 2016, 98-B: 6-9
- [13] Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, et al. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone*, 2015, 70: 93-101
- [14] Cook JJ, Summers NJ, Cook EA. Healing in the new millennium: bone stimulators: an overview of where we've been and where we may be heading. *Clin Podiatr Med Surg*, 2015, 32: 45-59
- [15] Hannouche D, Petite H, Sedel L. Current trends in the enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg Br*, 2001, 83: 157-64
- [16] Friedenber ZB, Harlow MC, Brighton CT. Healing of nonunion of the medial malleolus by means of direct current: a case report. *J Trauma*, 1971, 11: 883-5
- [17] Becker RO, Spadaro JA, Marino AA. Clinical experiences with low intensity direct current stimulation of bone growth. *Clin Orthop Relat Res*, 1977, 124: 75-83
- [18] Bhavsar MB, Han Z, DeCoster T, et al. Electrical stimulation-based bone fracture treatment, if it works so well why do not more surgeons use it? *Eur J Trauma Emerg Surg*, 2020, 46: 245-64
- [19] Padilla F, Puts R, Vico L, et al. Stimulation of bone repair with ultrasound. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 880: 385-427

- [20] Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, et al. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Bone Joint Surg Am*, 1997, 79: 961-73
- [21] Lou S, Lv H, Li Z, et al. The effects of low-intensity pulsed ultrasound on fresh fracture: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96: e8181
- [22] Leighton R, Watson JT, Giannoudis P, et al. Healing of fracture nonunions treated with low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS): a systematic review and meta-analysis. *Injury*, 2017, 48: 1339-47
- [23] Roussignol X, Currey C, Duparc F, et al. Indications and results for the Exogen™ ultrasound system in the management of non-union: a 59-case pilot study. *Orthop Traumatol Surg Res*, 2012, 98: 206-13
- [24] Nishimura R, Hata K, Ikeda F, et al. Signal transduction and transcriptional regulation during mesenchymal cell differentiation. *J Bone Miner Metab*, 2008, 26: 203-12
- [25] Govender S, Csimma C, Genant HK, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am*, 2002, 84: 2123-34
- [26] James AW, LaChaud G, Shen J, et al. A review of the clinical side effects of bone morphogenetic protein-2. *Tissue Eng Part B Rev*, 2016, 22: 284-97
- [27] Xiong C, Daubs MD, Montgomery SR, et al. BMP-2 adverse reactions treated with human dose equivalent dexamethasone in a rodent model of soft-tissue inflammation. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2013, 38: 1640-7
- [28] Glaeser JD, Salehi K, Kanim LEA, et al. Anti-inflammatory peptide attenuates edema and promotes BMP-2-induced bone formation in spine fusion. *Tissue Eng Part A*, 2018, 24: 1641-51
- [29] Khorsand B, Nicholson N, Do AV, et al. Regeneration of bone using nanoplex delivery of FGF-2 and BMP-2 genes in diaphyseal long bone radial defects in a diabetic rabbit model. *J Control Release*, 2017, 248: 53-9
- [30] Herberg S, McDermott AM, Dang PN, et al. Combinatorial morphogenetic and mechanical cues to mimic bone development for defect repair. *Sci Adv*, 2019, 5: eaax2476
- [31] 靳良宇, 李伟明. Nell-1在骨组织工程中的作用与应用. *中国组织工程研究*, 2020, 24: 3217-25
- [32] Peichl P, Holzer LA, Maier R, et al. Parathyroid hormone 1-84 accelerates fracture-healing in pubic bones of elderly osteoporotic women. *J Bone Joint Surg Am*, 2011, 93: 1583-7
- [33] Miller PD, Hattersley G, Riis BJ, et al. Effect of abaloparatide vs placebo on new vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: a randomized clinical trial. *JAMA*, 2016, 316: 722-33
- [34] L PK, Kandoi S, Misra R, et al. The mesenchymal stem cell secretome: a new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2019, 46: 1-9
- [35] Fu X, Liu G, Halim A, et al. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells*, 2019, 8: 784
- [36] Garg P, Mazur MM, Buck AC, et al. Prospective review of mesenchymal stem cells differentiation into osteoblasts. *Orthop Surg*, 2017, 9: 13-9
- [37] Gomezbarrena E, Rosset P, Gebhard F, et al. Feasibility and safety of treating non-unions in tibia, femur and humerus with autologous, expanded, bone marrow-derived mesenchymal stromal cells associated with biphasic calcium phosphate biomaterials in a multicentric, non-comparative trial. *Biomaterials*, 2019, 196: 100-8
- [38] Wang X, Chu W, Zhuang Y, et al. Bone mesenchymal stem cell-enriched β -tricalcium phosphate scaffold processed by the screen-enrich-combine circulating system promotes regeneration of diaphyseal bone non-union. *Cell Transplant*, 2019, 28: 212-23
- [39] Zhang Y, Hao Z, Wang P, et al. Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells enhance fracture healing through HIF-1 α -mediated promotion of angiogenesis in a rat model of stabilized fracture. *Cell Prolif*, 2019, 52: e12570
- [40] Ding DC, Chang YH, Shyu WC, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplant*, 2015, 24: 339-47
- [41] Li T, Xia M, Gao Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15: 1293-306
- [42] Li N, Song J, Zhu G, et al. Periosteum tissue engineering-a review. *Biomater Sci*, 2016, 4: 1554-61
- [43] 谢杨丽, 黄俊兰, 陈涵纲, 等. 成纤维细胞生长因子信号在骨损伤修复中的作用. *生命科学*, 2020, 32: 239-44
- [44] Su N, Du X, Chen L. FGF signaling: its role in bone development and human skeleton diseases. *Front Biosci*, 2008, 13: 2842-65
- [45] Schmid GJ, Kobayashi C, Sandell LJ, et al. Fibroblast growth factor expression during skeletal fracture healing in mice. *Dev Dyn*, 2009, 238: 766-74
- [46] Shimoaka T, Ogasawara T, Yonamine A, et al. Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10. *J Biol Chem*, 2002, 277: 7493-500
- [47] Murahashi Y, Yano F, Nakamoto H, et al. Multi-layered PLLA-nanosheets loaded with FGF-2 induce robust bone regeneration with controlled release in critical-sized mouse femoral defects. *Acta Biomater*, 2019, 85: 172-9
- [48] Ornitz DM, Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes Dev*, 2015, 29: 1463-86
- [49] 钱洲曜, 王勇平. 血管内皮生长因子有望成为加速骨折愈合的全新治疗手段. *中国组织工程研究*, 2020, 24: 2759-69
- [50] Hu K, Olsen BR. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *J Clin Invest*, 2016, 126: 509-26
- [51] 李旭, 陈依民, 王鼎予, 等. 骨血管形成机制及功能的研究进展. *解剖学报*, 2019, 50: 703-6
- [52] Liu Y, Berendsen AD, Jia S, et al. Intracellular VEGF

- regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *J Clin Invest*, 2012, 122: 3101-13
- [53] Orth M, Shenar AK, Scheuer C, et al. VEGF-loaded mineral-coated microparticles improve bone repair and are associated with increased expression of epo and RUNX-2 in murine non-unions. *J Orthop Res*, 2019, 37: 821-31
- [54] Pennock S, Kazlauskas A. Vascular endothelial growth factor A competitively inhibits platelet-derived growth factor (PDGF)-dependent activation of PDGF receptor and subsequent signaling events and cellular responses. *Mol Cell Biol*, 2012, 32: 1955-66
- [55] Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, et al. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature*, 2008, 456: 809-13
- [56] Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*, 2008, 22: 1276-312
- [57] Schwarz F, Sager M, Ferrari D, et al. Influence of recombinant human platelet-derived growth factor on lateral ridge augmentation using biphasic calcium phosphate and guided bone regeneration: a histomorphometric study in dogs. *J Periodontol*, 2009, 80: 1315-23
- [58] Al-Zube L, Breitbart EA, O'Connor JP, et al. Recombinant human platelet-derived growth factor BB (rhPDGF-BB) and β -tricalcium phosphate/collagen matrix enhance fracture healing in a diabetic rat model. *J Orthop Res*, 2009, 27: 1074-81
- [59] Hollinger JO, Hart CE, Hirsch SN, et al. Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*, 2008, 90 Suppl 1: 48-54
- [60] Daniels TR, Younger AS, Penner MJ, et al. Prospective randomized controlled trial of hindfoot and ankle fusions treated with rhPDGF-BB in combination with a β -TCP-collagen matrix. *Foot Ankle Int*, 2015, 36: 739-48
- [61] DiGiovanni CW, Lin SS, Baumhauer JF, et al. Recombinant human platelet-derived growth factor-BB and β -tricalcium phosphate (rhPDGF-BB/ β -TCP): an alternative to autogenous bone graft. *J Bone Joint Surg Am*, 2013, 95: 1184-92
- [62] Majidinia M, Sadeghpour A, Yousefi B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *J Cell Physiol*, 2018, 233: 2937-48
- [63] 马应亚, 岳野, 虎义平, 等. 骨折愈合的影响因素概述. *中国当代医药*, 2015, 22: 25-30
- [64] Ding ZC, Lin YK, Gan YK, et al. Molecular pathogenesis of fracture nonunion. *J Orthop Translat*, 2018, 14: 45-56
- [65] Lau KW, Rundle CH, Zhou XD, et al. Conditional deletion of IGF-I in osteocytes unexpectedly accelerates bony union of the fracture gap in mice. *Bone*, 2016, 92: 18-28
- [66] Mathieu M, Rigutto S, Ingels A, et al. Decreased pool of mesenchymal stem cells is associated with altered chemokines serum levels in atrophic nonunion fractures. *Bone*, 2013, 53: 391-8
- [67] Weiss S, Henle P, Bidlingmaier M, et al. Systemic response of the GH/IGF-I axis in timely versus delayed fracture healing. *Growth Horm IGF Res*, 2008, 18: 205-12
- [68] Boonen S, Rosen C, Bouillon R, et al. Musculoskeletal effects of the recombinant human IGF-I/IGF binding protein-3 complex in osteoporotic patients with proximal femoral fracture: a double-blind, placebo-controlled pilot study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87: 1593-9
- [69] Tian Y, Xu Y, Xue T, et al. Notch activation enhances mesenchymal stem cell sheet osteogenic potential by inhibition of cellular senescence. *Cell Death Dis*, 2017, 8: e2595
- [70] Hilton MJ, Tu X, Wu X, et al. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nat Med*, 2008, 14: 306-14
- [71] Wang C, Inzana JA, Mirando AJ, et al. NOTCH signaling in skeletal progenitors is critical for fracture repair. *J Clin Invest*, 2016, 126: 1471-81
- [72] Dishowitz MI, Zhu F, Sundararaghavan HG, et al. Jagged1 immobilization to an osteoconductive polymer activates the Notch signaling pathway and induces osteogenesis. *J Biomed Mater Res A*, 2014, 102: 1558-67
- [73] Lerner UH, Ohlsson C. The WNT system: background and its role in bone. *J Intern Med*, 2015, 277: 630-49
- [74] Chen Y, Whetstone HC, Lin AC, et al. β -catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. *PLoS Med*, 2007, 4: e249
- [75] Minear S, Leucht P, Jiang J, et al. Wnt proteins promote bone regeneration. *Sci Transl Med*, 2010, 2: 29ra30
- [76] Wang Y, Newman MR, Benoit DSW. Development of controlled drug delivery systems for bone fracture-targeted therapeutic delivery: a review. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018, 127: 223-36
- [77] Bleedorn JA, Sullivan R, Lu Y, et al. Percutaneous lovastatin accelerates bone healing but is associated with periosseous soft tissue inflammation in a canine tibial osteotomy model. *J Orthop Res*, 2014, 32: 210-6
- [78] Clément-Lacroix P, Ai M, Morvan F, et al. Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 17406-11
- [79] Jin H, Wang B, Li J, et al. Anti-DKK1 antibody promotes bone fracture healing through activation of β -catenin signaling. *Bone*, 2015, 71: 63-75
- [80] Suen PK, He YX, Chow DH, et al. Sclerostin monoclonal antibody enhanced bone fracture healing in an open osteotomy model in rats. *J Orthop Res*, 2014, 32: 997-1005
- [81] Florio M, Gunasekaran K, Stolina M, et al. A bispecific antibody targeting sclerostin and DKK-1 promotes bone mass accrual and fracture repair. *Nat Commun*, 2016, 7: 11505
- [82] Jones SE, Jomary C. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays*, 2002, 24: 811-20
- [83] Gaur T, Wixted JJ, Hussain S, et al. Secreted frizzled related protein 1 is a target to improve fracture healing. *J Cell Physiol*, 2009, 220: 174-81
- [84] Moore WJ, Kern JC, Bhat R, et al. Modulation of Wnt

- signaling through inhibition of secreted frizzled-related protein I (sFRP-1) with N-substituted piperidinyl diphenylsulfonyl sulfonamides. *J Med Chem*, 2009, 52: 105-16
- [85] Li CH, Amar S. Inhibition of SFRP1 reduces severity of periodontitis. *J Dent Res*, 2007, 86: 873-7
- [86] Fang C, Cai H, Kuong E, et al. Surgical applications of three-dimensional printing in the pelvis and acetabulum: from models and tools to implants. *Unfallchirurg*, 2019, 122: 278-85
- [87] Wang T, Wang D, Liu J, et al. Acidity-triggered ligand-presenting nanoparticles to overcome sequential drug delivery barriers to tumors. *Nano Lett*, 2017, 17: 5429-36