

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.15.024

PDGFR β -PI3K 信号轴介导骨折愈合过程中骨膜细胞
激活的分子机制研究李伍建,何少波,任 聪,郑璉喆,刘继超[△]

通用医疗三二〇一医院骨科,陕西汉中 723000

摘要:目的 验证血小板源性生长因子受体 β /磷酸肌醇 3-激酶(PDGFR β -PI3K)相互作用对于介导骨折后强大的骨膜细胞活化是否有必要。方法 收集正常活动或骨折手术后 3 d 的小鼠骨膜细胞进行体外原代培养,分为空白组、阴性组、shPDGFR β 组和各预处理组,空白组不做任何处理,阴性组和 shPDGFR β 组分别转染对照 shRNA 和 PDGFR β shRNA 慢病毒,72 h 后用于实验,各预处理组包括用生长因子(PDGF-BB,10 ng/mL)、PDGFR 抑制剂(SU16f,5 μ mol/L)、小分子 AKT 激活剂(SC79,4 μ g/mL)或 PI3K 激活剂(740 Y-P,25 nmol/L)单独或序贯处理 30 min。采用 Western blot 试验、流式细胞术、EdU 染色实验检测各组细胞蛋白表达水平和增殖活力。结果 与正常活动小鼠的骨膜细胞比较,骨折小鼠的骨膜细胞中 PDGFR β 蛋白表达水平升高约 2.31 倍。通过流式细胞术验证,骨折小鼠骨膜细胞中 PDGFR β 阳性率为(73.26 $\pm$ 3.17)%。在骨折小鼠的骨膜细胞实验中,shPDGFR β 组细胞 p-AKT 蛋白表达水平均低于空白组和阴性组,差异均有统计学意义($P<0.05$);而 PDGF-BB 组和 SC79 组细胞 p-AKT 蛋白表达水平一致,差异无统计学意义($P>0.05$)。与空白组(PI3K:1.22 $\pm$ 0.09, p-Tyr-PDGFR β :0.01 $\pm$ 0.01)比较,PI3K 激活剂 740 Y-P 组可上调 PI3K 水平(1.67 $\pm$ 0.13)和 p-Tyr-PDGFR β 水平(0.07 $\pm$ 0.01),差异均有统计学意义($P<0.05$),但对 PDGF β 水平无明显干扰。另外,与 740 Y-P 组[p-AKT(Ser473):0.32 $\pm$ 0.03]比较,740 Y-P+PDGF-BB 组进一步上调了骨膜细胞中 p-Tyr-PDGFR β 水平(0.19 $\pm$ 0.01)和 p-AKT(Ser473)水平(0.51 $\pm$ 0.05),差异均有统计学意义($P<0.05$)。在体外增殖实验中,没有对于用 740 Y-P 预处理的细胞,加入 PDGF-BB 后,细胞增殖活性几乎恢复至阴性组水平,明显高于未用 740 Y-P 预处理的细胞。结论 PDGFR β -PI3K 信号轴对于骨折愈合早期阶段的骨膜活化是有必要的。

关键词:血小板源性生长因子受体 β ; 磷脂酰肌醇 3-激酶; 骨折愈合; 骨膜活化; 分子机制

中图法分类号:R683;R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)15-2265-05

Molecular mechanism of PDGFR β -PI3K signaling axis mediating periosteal
cell activation during fracture healing

LI Wujian, HE Shaobo, REN Cong, ZHENG Jinzhe, LIU Jichao[△]

Department of Orthopedics, General Medical 3201 Hospital, Hanzhong, Shaanxi 723000, China

Abstract: Objective To verify whether platelet-derived growth factor receptor β /phosphatidylinositol 3-kinase (PDGFR β -PI3K) interaction is necessary for mediating robust periosteal cell activation after fracture. **Methods** Periosteal cells were collected from mice with normal activity or 3 days after fracture surgery for primary culture in vitro. The cells were divided into blank group, negative group, shPDGFR β group and each pretreatment group. The blank group did not receive any treatment, while the negative group and shPDGFR β group were transfected with control shRNA and PDGFR β shRNA lentivirus respectively, and used for the experiment after 72 hours. The pretreatment groups included growth factor (PDGF-BB, 10 ng/mL), PDGFR inhibitor (SU16f, 5 μ mol/L), small molecule AKT activator (SC79, 4 μ g/mL) or PI3K activator (740 Y-P, 25 nmol/L) alone or sequentially treated for 30 min. Western blot assay, flow cytometry, and EdU staining were used to detect the protein expression level and proliferation activity of cells in each group. **Results** Compared with the periosteal cells of normal active mice, the expression level of PDGFR β protein in the periosteal cells of fracture mice was increased by about 2.31 times. The positive rate of PDGFR β in periosteal cells of fracture mice was (73.26 $\pm$ 3.17)% verified by flow cytometry. In the periosteal cell experiment of fracture mice, the expression level of p-Akt protein in shPDGFR β group was lower than that in the blank group and the negative group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). However, there was no significant difference in the expression of p-Akt protein between PDGF-BB group and SC79 group ($P>0.05$). Compared with the

blank group (PI3K: 1.22 ± 0.09 , p-Tyr-PDGFR β : 0.01 ± 0.01), the PI3K activator 740 Y-P group could increase the level of PI3K (1.67 ± 0.13) and p-Tyr-PDGFR β (0.07 ± 0.01), and the differences were statistically significant ($P < 0.05$), but there was no significant interference on the level of PDGFR β . In addition, compared with the 740 Y-P group [p-AKT (Ser473): 0.32 ± 0.03], the 740 Y-P + PDGF-BB group further increased p-Tyr-PDGFR β level (0.19 ± 0.01) and p-Akt (Ser473) level (0.51 ± 0.05) in the periosteal cells, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). In the in vitro proliferation experiment, the proliferation activity of the cells pretreated with 740 Y-P was almost restored to the level of the negative group after adding PDGF-BB, which was significantly higher than that of the cells without 740 Y-P pretreatment. **Conclusion** PDGFR beta PI3K signaling shaft for fracture healing in the early stages of periosteum activation is necessary.

Key words: platelet-derived growth factor receptor β ; phosphatidylinositol 3-kinase; fracture healing; periosteum activation; molecular mechanism

据报道, 5%~10% 的长骨骨折会导致骨不连^[1]。对于延迟愈合或骨不连的患者, 临床实践中的药物选择有限, 深入阐述骨膜细胞初始激活和扩增机制有助于改进治疗方法。骨膜是骨外表面的致密结缔组织^[2], 急性损伤后, 骨膜层内的祖细胞在骨折部位紧邻的区域迅速增殖, 被称为骨膜活化, 对于骨折愈合至关重要^[3]。磷酸肌醇 3-激酶 (PI3K) 可深度参与多种细胞 (包括成骨细胞) 的增殖、分化和存活, 在成骨、骨骼重塑和成骨谱系中具有重要意义^[4-6]。血小板源性生长因子 (PDGF) 是间充质祖细胞的有效丝裂原, 在初始炎症反应期间由骨折部位的血小板和巨噬细胞释放^[7]。在参与骨折愈合的主要生长因子受体中, PI3K 可直接结合 PDGF 受体 (PDGFRs)^[4]。有研究表明, 大多数骨折后的小鼠骨膜细胞表达同源二聚体 PDGFR β 或异二聚体 PD-GFR α/β , 而很少有细胞单独表达 PDGFR α ^[8]。因此, 假设 PI3K 和 PDGFR β 之间的直接作用可能会影响骨折愈合, 本研究旨在初步探讨 PDGFR β -PI3K 信号轴在最初骨折愈合反应中是否可介导骨膜细胞增殖, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 4 只 7~9 周正常活动或稳定闭合性股骨骨折手术后 3 d 小鼠 (由西安交通大学动物中心提供), 体质量约为 5 g, 雌雄不限。所有动物均按照标准化流程饲养, 并得到西安交通大学医学伦理委员会审核批准 (L2019XJS0122)。

1.2 仪器与试剂 α MEM 培养液 (美国 SIGMA 公司); 热灭活胎牛血清 (FBS, 美国 Hyclone 公司); 慢病毒 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); Trizol 试剂、Superscript III cDNA 合成试剂盒、SYBRGreen 聚合酶链反应 (PCR) 试剂 (美国 Invitrogen 公司); 蛋白印迹用一级抗体 (稀释比 1:500, 英国 Abcam 公司); PacBlue-CD45 抗体、PacBlue-Ter119 抗体、PacBlue-CD31 抗体、A700-Sca1 抗体、PerCP-Cy5.5-CD105 抗体、PE-CD140b (PDGFR β) 抗体、FITC-CD29 抗体和 APC-CD140a (PDGFR α) 抗体 (美国 eBioscience 公司); Zombie UVTM Fixable 活性试剂盒 (美国 Biolegend 公司); Bio-Rad 实时荧光定量 PCR 系统 (美国 Bio-

Rad 公司); 40 μ m 筛网过滤器 (美国 Fisher Scientific 公司); Click-iT EdU 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); BD-LSRII 流式细胞仪 (美国 Becton-Dickinson 公司)。

1.3 骨膜细胞获取 如 SCANLON 等^[9] 研究所述, 分别从小鼠的股骨和胫骨中分离出骨膜细胞。方法如下: 用手术刀小心剔除骨表面的肌肉、韧带和结缔组织, 从骨末端切下骨髓, 用 26 号针头冲洗骨髓, 使用完全培养基 (α MEM 培养液中添加 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素)。从冲洗后的空心骨中刮取骨膜置于磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 先裂解红细胞, 加入 0.05% I 型胶原酶 + 0.2% 透明质酸酶, 消化 1 h。加入 PBS 终止反应, 过滤器过滤以形成单细胞悬浮液并去除碎屑。每只小鼠收集约 $(2\sim4) \times 10^6$ 个细胞。

1.4 骨膜细胞培养和转染 将收集的骨膜细胞培养于 6 cm $\times$ 6 cm 细胞培养板中, 在 5% O₂ 环境下培养 4 d, 然后转移到常氧 (20% O₂) 环境中。将原代骨膜细胞分组处理。(1) 空白组: 细胞不做任何转染处理; (2) 阴性组: 用对照 shRNA 和 PDGFR β shRNA 慢病毒以 10^8 vg/mL 的浓度分别感染骨膜细胞 (6 孔板中 4×10^5 个细胞/孔) 72 h, 用完全培养基替代转染培养基继续培养; (3) shPDGFR β 组: 用对照 shRNA 和 PDGFR β shRNA 慢病毒以 10^8 vg/mL 的浓度分别感染骨膜细胞 (6 孔板中 4×10^5 个细胞/孔) 72 h, 用完全培养基替代转染培养基继续培养; (4) 各预处理组, 包括用生长因子 (PDGF-BB, 10 ng/mL)、PDGFR 抑制剂 (SU16f, 5 μ mol/L)、小分子 AKT 激活剂 (SC79, 4 μ g/mL) 或 PI3K 激活剂 (740 Y-P, 25 nmol/L) 单独或序贯处理 30 min。

1.5 方法

1.5.1 Western blot 试验 将骨膜细胞在修饰的放射免疫沉淀法裂解缓冲液中裂解, 并在 8% 或 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳上电泳分离总细胞裂解物。用 PDGFR β 抗体探测蛋白质印迹。使用 Odyssey2.1 红外成像系统软件 (美国 LICOR Biosciences 公司) 量化单个条带中的蛋白质量。

1.5.2 流式细胞术 将骨膜细胞置于含有 4-羟甲基

哌嗪乙磺酸和 2%FBS 的汉克斯平衡盐溶液中。分别与荧光染料标记抗体冰浴孵育 1 h。在染色介质中洗涤细胞后,用 Zombie UVTM 试剂对细胞进行染色,并进行流式细胞分析。检测表达骨膜标志物如 Sca1、CD105 和 CD29 的 CD45-CD31-Ter119-三阴性(TN)细胞的百分比。检测这些阴性中 PDGFR α 和 PDGFR β 阳性细胞水平。数据以表达 PDGFR α 、PDGFR β 或 PDGFR α/β 的间充质细胞的百分比表示。

1.5.3 体外细胞增殖实验 将骨膜细胞以 4×10^5 个细胞/孔接种于 6 孔板中,并与生长培养基孵育过夜。将培养基更换为 DMEM(含 0.5%FBS 和 1%青霉素/链霉素)培养过夜以重组 PDGFR 等位基因。细胞先用 PDGF-BB(10 ng/mL)和 5-乙基-2'-脱氧尿苷(EdU,10 μ mol/L)的组合处理 4 h,然后通过胰蛋白酶化处理,并进行 EdU 染色。通过流式细胞术检测活的单细胞 EdU⁺ 细胞的数量,并使用 DIVA 和 FlowJo 软件进行分析。

1.6 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PDGFRs 在骨膜细胞中的表达 与正常活动小鼠的骨膜细胞比较,骨折小鼠的骨膜细胞中 PDGFR β 蛋白表达水平升高约 2.31 倍,见图 1A。通过流式细胞术验证,骨折小鼠骨膜细胞中 PDGFR β 阳性率为

(73.26 $\pm$ 3.17)%,而 PDGFR α/β 阳性率和 PDGFR α 阳性率仅为(6.03 $\pm$ 0.26)%和(4.95 $\pm$ 0.21%)。见图 1B。

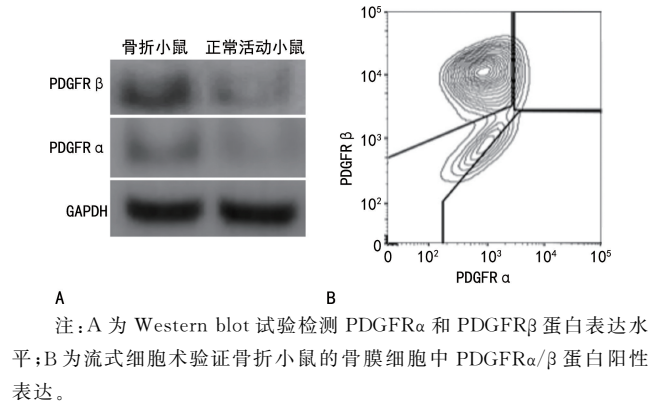
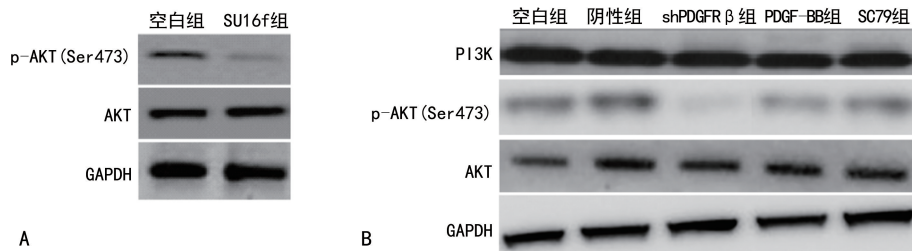


图 1 PDGFRs 在骨膜细胞中的表达

2.2 PDGF β 表达对骨膜细胞中 AKT 活化的影响 在骨折小鼠的骨膜细胞实验中,SU16f 组原代骨膜细胞 p-AKT 蛋白表达水平为 0.20 ± 0.03 ,明显低于空白组的 0.71 ± 0.09 ,差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步分析显示,与空白组比较,阴性组 p-AKT 蛋白表达水平为 0.74 ± 0.07 ,差异无统计学意义($P>0.05$);与阴性组比较,shPDGFR β 组细胞 p-AKT 蛋白表达水平降低至 0.11 ± 0.02 ,差异有统计学意义($P<0.05$);而 PDGF-BB 组(0.41 ± 0.03)和 SC79 组(0.44 ± 0.03)细胞 p-AKT 蛋白表达水平均高于 shPDGFR β 组,差异均有统计学意义($P<0.05$);但 PDGF-BB 组和 SC79 组 p-AKT 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 2。



注:A 为空白组和 SU16f 组未经转染处理的原代骨膜细胞;B 为各处理组经转染处理的原代骨膜细胞。

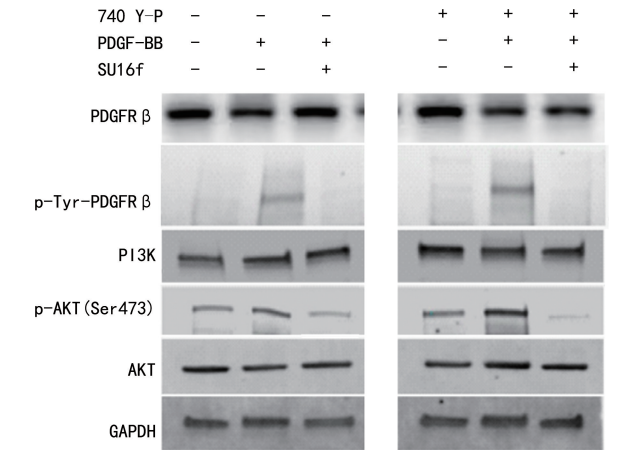
图 2 Western blot 试验检测各组骨膜细胞 AKT 蛋白表达水平

2.3 PDGFR β 通过结合 PI3K 诱导 AKT 活化 在骨折小鼠的骨膜细胞实验中,与空白组(PI3K: 1.22 ± 0.09 ,p-Tyr-PDGFR β : 0.01 ± 0.00)比较,PI3K 激活剂 740 Y-P 组可上调 PI3K 水平(1.67 ± 0.13)和 p-Tyr-PDGFR β 水平(0.07 ± 0.01),差异均有统计学意义($P<0.05$),但对 PDGF β 水平无明显干扰。另外,与 740 Y-P 组[p-AKT(Ser473): 0.32 ± 0.03]比较,740 Y-P+PDGF-BB 组进一步上调了骨膜细胞中 p-Tyr-PDGFR β 水平(0.19 ± 0.01)和 p-AKT(Ser473)水平(0.51 ± 0.05),差异均有统计学意义($P<0.05$)。相反,与 740 Y-P 组比较,740 Y-P+PDGFR 抑制剂

SU16f 组 p-AKT(Ser473)水平(0.06 ± 0.01)降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。

2.4 各组细胞增殖活性比较 在骨折小鼠来源骨膜细胞的体外增殖实验中,未用 740 Y-P 预处理,阴性组细胞增殖活性[(4.98 $\pm$ 0.33)%]与空白组[(5.02 $\pm$ 0.33)%]一致,用 740 Y-P 预处理,阴性组细胞增殖活性[(6.15 $\pm$ 0.41)%]与空白组[(6.09 $\pm$ 0.32)%]也一致,差异均无统计学意义($P>0.05$)。而 shPDGFR β 组未用 740 Y-P 预处理细胞增殖活性[(3.05 $\pm$ 0.26)%],用 740 Y-P 预处理细胞增殖活性[(4.27 $\pm$ 0.30)%]与阴性组和空白组比较均明显降

低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。加入外源性 PDGF-BB 刺激 shPDGFR β 组骨膜细胞的增殖活性 $[(5.99\pm0.32)\%]$ 和未加入外源性 PDGF-BB 刺激未处理 shPDGFR β 组骨膜细胞的增殖活性 $[(3.78\pm0.20)\%]$ 与阴性组和空白组比较均明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。尤其是对于用 740 Y-P 预处理的细胞,加入 PDGF-BB 后,细胞增殖活性恢复至阴性组水平,但是对于未用 740 Y-P 预处理的细胞,加入 PDGF-BB 后,细胞增殖活性仍然低于阴性组水平。



注: +表示添加了该试剂, -表示未添加该试剂。

图 3 PI3K 上调使骨膜细胞对 PDGF-BB/PDGFR β 的作用更敏感

3 讨 论

迄今为止,在骨折愈合早期骨膜细胞成骨化背景下,PI3K 信号在骨膜中的作用尚很少被探索。Wnt、Notch、BMP 和其他主要通路均与影响骨折的骨膜活化有关,而 PI3K 是这些信号通路下游的主要节点^[4-5]。目前,绝大多数关于 PI3K 在控制骨细胞分化和功能方面的作用研究都是使用基因敲除小鼠模型完成的^[10-11]。本研究利用体外培养的原代骨膜细胞证实骨折小鼠的原代骨膜细胞中 PDGFR β 上调明显,并通过 PI3K/AKT 途径促进骨膜活化;并且上调骨膜细胞中 PI3K 活性可以进一步增强 PDGF/PDGFR 信号通路的作用。总之,本文初步探索了 PDGF 促进骨膜活化的机制,这可能为开发和改进促进骨折愈合的治疗方法提供有价值的见解。

骨折后强有力的骨膜激活和扩张,为损伤部位提供了更多的骨软骨祖细胞,这有助于骨折愈合过程^[12]。本研究收集了骨折小鼠的原代骨膜细胞,首先确定了在 PI3K 介导的骨膜激活背景下对完整的 PDGF/PDGFR β 信号传导的要求。骨折小鼠来源的骨膜细胞,在体外培养中,PDGFR β 阳性表达率为 $(73.26\pm3.17)\%$,与 PDGFR β 比较,PDGFR α/β 阳性率和 PDGFR α 阳性率仅为 $(6.03\pm0.26)\%$ 和 $(4.95\pm0.21)\%$ 。这些结果强化了本文的假设,即 PDGFR β 是介导骨膜活化的关键受体^[8,13],进一步分析表明,外

源性 PDGF-BB 处理骨膜细胞使 AKT 磷酸化程度与 AKT 小分子激活剂 SC79 类似。这些结果证实了在骨膜细胞中,PDGF 与其受体结合可非常有效地激活 PI3K-AKT 信号。结合既往的研究结果,即 PDGF 能够最大限度地诱导多种生长因子的 AKT 磷酸化,以及生长因子参与骨骼愈合的文献知识^[14],有信心在骨膜中寻找 PDGFR β /PI3K 信号轴。

在骨折小鼠来源的骨膜细胞实验中,通过 PI3K 激活剂 740 Y-P 上调骨膜细胞中 PI3K 表达后,尽管 PDGFR β 表达没有受到明显影响,但是与空白组比较,向 740 Y-P 组培养物中添加 PDGF-BB 可进一步诱导下游 AKT 磷酸化。表明上调 PI3K 活性虽然在基线时对骨膜细胞 PDGFR β 没有影响,但可能会启动细胞对生长因子的特定信号反应,例如 PI3K/AKT 信号通路增强。PDGF 是一种有丝分裂原,以前已被证明可以在体外和体内影响间充质细胞的增殖和扩增^[15]。在骨折愈合的最早阶段,血小板和巨噬细胞均会释放大量 PDGF^[16]。PDGFR β 是间充质基质细胞功能的有效调节因子。DOHERTY 等^[17]研究发现,在条件敲除小鼠模型中,增加的 PDGFR β 信号传导可驱动细胞增殖并抑制血管平滑肌的分化,从而维持体内祖细胞潜力。间充质基质细胞中 PDGFR β 的耗竭也降低了增殖和迁移反应,同时促进了成骨分化。JEFFERY 等^[18]研究指出,内源性干细胞的动员和激活是组织再生背景下的一个重要研究领域。在骨骼或椎体损伤部位加用 PDGF 已被提出作为骨愈合和修复的可能疗法。本研究结果显示,与空白组比较,PDGF-BB 处理增强了 740 Y-P 组骨膜细胞中 AKT 的磷酸化水平。当用 PDGFR β 抑制剂 SU16f 处理细胞时,AKT 磷酸化明显降低,显示 PDGF 的特异性作用。而且,用 PDGF-BB 处理骨膜细胞导致 PDGFR β 的磷酸化增强,甚至 740 Y-P 组细胞 PDGFR β 磷酸化水平增加超过空白组的 3 倍。而且体外增殖实验也证实了这一点,即对于用 740 Y-P 预处理的细胞,加入 PDGF-BB 后,细胞增殖活性几乎恢复至阴性组水平,明显高于未用 740 Y-P 预处理的细胞。这些结果说明,骨膜细胞中 PI3K 活性上调可以增强 PDGF/PDGFR 信号通路的作用。总之,有理由相信 PI3K 激活可以通过增强 PDGF/PDGFR 结合的下

游信号传导效应来增强治疗效果。例如使用 PI3K 激活剂 740 Y-P 或强效 AKT 激活剂 SC79 均可增加骨膜细胞对 PDGFR β 作用的敏感性,甚至可以利用骨折部位产生的内源性生长因子,绕过对超生理剂量的 PDGF 的需求。

本研究有一些小的局限性,例如研究范围仅限于原代培养的骨膜祖细胞,缺乏体内实验验证结果。尚未探索 PDGFR/PI3K 信号轴在参与骨折愈合的其他祖细胞中的可能性;然而,与骨髓基质和血管周围细胞比较,骨膜是骨骼修复的主要贡献者。

综上所述,本研究表明,在 PI3K 介导的骨折愈合的最早阶段,PDGFR β 信号传导对于促进骨膜激活是必要的。PI3K 信号传导增强了 PDGF 在骨折愈合反应中的作用,这些信息有助于指导临床精准医疗。更深入地了解介导骨膜损伤反应的分子机制,对于开发新的、更有效的治疗方法来减少延迟骨愈合和骨不连的发生率至关重要。

参考文献

[1] 万家明,巨积辉,侯瑞兴. 胫骨骨不连研究进展[J]. 国际骨科学杂志,2022,43(5):293-296.

[2] 蒋昇源,宫智浩,宋凯凯,等. 骨膜在骨折愈合及骨组织修复过程中的作用[J]. 中国组织工程研究,2020,24(30):4860-4865.

[3] WANG T,ZHANG X P,BIKLE D D. Osteogenic differentiation of periosteal cells during fracture healing[J]. J Cell Physiol,2017,232(5):913-921.

[4] DONG J,XU X Q,ZHANG Q Y, et al. The PI3K/AKT pathway promotes fracture healing through its crosstalk with Wnt/ β -catenin [J]. Exp Cell Res, 2020, 394 (1): 112137.

[5] 孙文星,黄万新,刘传慧,等. 黄芪多糖通过 PI3K/AKT/mTOR 促进激素性骨质疏松症大鼠成骨细胞增殖[J]. 中国骨质疏松杂志,2023,29(1):35-40.

[6] 胡俊,谈荣珍,袁忠,等. 锁阳多糖通过激活 PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin 信号通路促进 MC3T3-E1 细胞成骨分化[J]. 实用医学杂志,2022,38(22):2774-2779.

[7] NOVAK S,MADUNIC J,SHUM L, et al. PDGF inhibits BMP2-induced bone healing[J]. NPJ Regen Med,2023,8(1):3.

[8] WANG X,MATTHEWS B G,YU J, et al. PDGF modulates BMP2-Induced osteogenesis in periosteal progenitor cells[J]. JBMR Plus,2019,3(5):e10127.

[9] SCANLON V,SOUNG D Y,ADAPALA N S, et al. Role of Cbl-PI3K interaction during skeletal remodeling in a

murine model of bone repair[J]. PLoS One,2015,10(9):e0138194.

[10] SCANLON V,WALIA B,YU J, et al. Loss of Cbl-PI3K interaction modulates the periosteal response to fracture by enhancing osteogenic commitment and differentiation [J]. Bone,2017,95:124-135.

[11] LIU S,HUANG Y Z,TIAN S J, et al. Hyperhomocysteinemia inhibits tibial fracture healing in rats through PI3K/AKT signaling pathway[J]. Exp Ther Med,2020,19(3):2083-2088.

[12] PERRIN S,COLNOT C. Periosteal skeletal stem and progenitor cells in bone regeneration[J]. Curr Osteoporos Rep, 2022,20(5):334-343.

[13] NEGRI S,WANG Y Y,LI Z, et al. Acetabular reaming is a reliable model to produce and characterize periarticular heterotopic ossification of the hip[J]. Stem Cells Transl Med,2022,11(8):876-888.

[14] LIU Y,DUAN M M,GUO D M, et al. PDGF-AA promotes cell-to-cell communication in osteocytes through PI3K/Akt signaling pathway[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),2021,53(12):1640-1649.

[15] 李琳,蔡宇艺,何江峰,等. 血小板衍生生长因子-BB 对骨髓间充质干细胞多向分化及自噬相关蛋白表达的影响[J]. 同济大学学报(医学版),2022,43(2):165-173.

[16] 颜春琴,梁娣,何东安. 胫骨骨折术后延迟愈合患者血清黏附分子等水平变化研究[J]. 浙江创伤外科,2020,25(6):1080-1081.

[17] DOHERTY L,YU J,WANG X, et al. A PDGFR β -PI3K signaling axis mediates periosteal cell activation during fracture healing[J]. PLoS One,2019,14(10):e0223846.

[18] JEFFERY E C,MANN T,POOL J A, et al. Bone marrow and periosteal skeletal stem/progenitor cells make distinct contributions to bone maintenance and repair[J]. Cell Stem Cell,2022,29(11):1547-1561.

(收稿日期:2023-10-10 修回日期:2024-05-11)

(上接第 2264 页)

[13] GOLIGHER E C,DRES M,FAN E, et al. Mechanical ventilation-induced diaphragm atrophy strongly impacts clinical outcomes[J]. Am J Respir Crit Care Med,2018,197(2):204-213.

[14] RICOY J,RODRÍGUEZ-NÚÑEZ N,ÁLVAREZ-DOBAÑO J M, et al. Diaphragmatic dysfunction [J]. Pulmonology, 2019,25(4):223-235.

[15] SUPINSKI G S,MORRIS P E,DHAR S, et al. Diaphragm dysfunction in critical illness[J]. Chest,2018,153(4):1040-1051.

[16] DEMOULE A,JUNG B,PRODANOVIC H, et al. Diaphragm dysfunction on admission to the intensive care unit. Prevalence,risk factors,and prognostic impact-a pro-

spective study[J]. Am J Respir Crit Care Med,2013,188(2):213-219.

[17] SUPINSKI G S,CALLAHAN L A. Diaphragm weakness in mechanically ventilated critically ill patients[J]. Crit Care,2013,17(3):R120.

[18] OLIVEIRA T S,SANTOS A T,ANDRADE C B V, et al. Sepsis disrupts mitochondrial function and diaphragm morphology[J]. Front Physiol,2021,12:704044.

[19] BLOISE F F,SANTOS A T,DE BRITO J, et al. Sepsis impairs thyroid hormone signaling and mitochondrial function in the mouse diaphragm[J]. Thyroid,2020,30(7):1079-1090.

(收稿日期:2023-10-11 修回日期:2024-05-14)