

免疫细胞在骨折愈合的研究进展及其发展前景

孙立鹏

山东第一医科大学附属山东省立医院骨科, 山东 济南

收稿日期: 2025年5月27日; 录用日期: 2025年6月19日; 发布日期: 2025年6月30日

摘要

骨折损伤发生后, 最初的炎症反应可能对骨折修复具有促进的作用。然而, 过度炎症对这一过程可能具有延缓作用, 迄今为止, 很少有研究能够明确阐明某些免疫细胞在骨折愈合中的作用, 鉴于骨折愈合并发症的高度临床相关性, 这种知识的缺乏尤其引人注目。本文就免疫细胞在骨愈合的研究进展及其发展前景作一综述, 拟为揭示免疫细胞在骨组织损伤修复中的调控作用。

关键词

免疫细胞, 骨折愈合, 适应性免疫, 巨噬细胞, 细胞疗法, 组织学工程, 骨免疫学

Research Progress and Future Prospects of Immune Cells in Fracture Healing

Lipeng Sun

Department of Orthopaedics, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan Shandong

Received: May 27th, 2025; accepted: Jun. 19th, 2025; published: Jun. 30th, 2025

Abstract

Following a fracture, the initial inflammatory response may promote the healing process. However, excessive inflammation can delay this process. To date, few studies have clearly elucidated the roles of specific immune cells in fracture healing. Given the high clinical relevance of fracture healing complications, this knowledge gap is particularly noteworthy. This review provides a comprehensive overview of the research progress on immune cells in bone healing and discusses future prospects, aiming to shed light on the regulatory roles of immune cells in bone tissue repair.

文章引用: 孙立鹏. 免疫细胞在骨折愈合的研究进展及其发展前景[J]. 临床医学进展, 2025, 15(6): 1743-1754.
DOI: 10.12677/acm.2025.1561910

Keywords

Immune Cells, Fracture Healing, Adaptive Immunity, Macrophages, Cell Therapy, Tissue Engineering, Osteoimmunology

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

骨折作为一种常见的创伤，可以由多种原因引起，包括：跌倒、骨质疏松、运动损伤等[1]。大多数骨折患者经过规范管理和治疗后几乎完全可以再生，然而，还有一部分患者出现不良愈合[2]，且这部分患者普遍存在骨折的急性或长期症状，增加了手术几率，延长康复时间，给患者带来极大痛苦[3]。随着人口老龄化的进展，尤其是老年人的骨折愈合不良的发生率明显提高[4]，因此预防骨骼损伤及进一步了解骨折愈合的机制有助于降低骨折发生率、减少不良愈合事件以及减轻社会整体负担。

骨折后的骨再生是一个复杂的多步骤过程，通常需要 3~12 周，研究人员将骨折愈合的复杂过程分为了五个连续且有重叠的阶段[5]，包括：损伤和血肿形成、炎症反应、软骨痂形成、硬骨痂形成以及骨重塑[6]。骨细胞、炎症因子以及参与骨折愈合的免疫细胞之间相互作用，最终促进骨折愈合的发生。免疫细胞广泛参与骨折或骨缺损部位的初始应答者修复脉管系统、启动级联信号，并招募细胞进行修复[7]。已有多种研究表明免疫细胞在骨折愈合中扮演了关键角色，并且引起了大量研究人员的广泛兴趣[8]。免疫细胞分为先天性免疫细胞及适应性免疫细胞，先天性免疫细胞包括：巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞，自然杀伤细胞(Natural Killer Cells, NK Cells)等，适应性免疫细胞包括：T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞。已有研究表明，适应性免疫的两种细胞，T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞在骨折损伤区域中以两个“波”存在。第一波发生在断裂后的最早时间，第二个“波”开始于编织骨形成后软骨的血管再生[9]。除此之外，巨噬细胞对于软、硬骨痂的形成以及正确的骨再生是必不可少的[10]。尽管没有骨折中 NK 耗竭的实验模型，但当在缺乏 T 和 B 淋巴细胞的小鼠骨折股骨干区域检测到高水平的干扰素- γ 时，已经充分阐明 NK 细胞在骨修复过程中的重要作用[11]。在大鼠脾切除模型中，骨折大鼠及体内巨噬细胞的募集以及炎症细胞因子的产生受到抑制从而引起骨折愈合延迟[12]。除了实验发现外，免疫受损的 HIV 患者可能会出现骨折的延迟愈合或者愈合不良[13]。

本文就免疫细胞、细胞因子及免疫-基质细胞的相互作用在骨折愈合中的研究进展作一综述，拟为骨折愈合的临床治疗提供新的思路和方法，降低骨折不良愈合的发生率，减轻社会负担。

2. 适应性免疫细胞在骨折愈合中的作用

骨折愈合是一个持续动态的过程，其需要细胞与细胞因子之间复杂的相互作用得以实现[14]。骨折发生后形成骨折血肿[15]，与此同时，炎症反应立即发生，触发骨折修复。骨骼免疫是近几年兴起的交叉学科，骨骼组织作为运动系统的一部分，同时也是重要的免疫器官[16]。免疫细胞与骨细胞这两种细胞系统均起源于骨髓，部分共享祖细胞(骨细胞/祖细胞)，并且在成熟的所有阶段相互交叉反应。骨组织与免疫细胞共处于骨髓微环境，既相互联系又相互调控。

2.1. T 细胞在骨折愈合中的作用

T 细胞作为适应性免疫的关键细胞，广泛参与调控骨再生过程中的各个阶段。T 细胞通过与间充质

干细胞、成骨细胞、破骨细胞的交互作用维持骨组织免疫微环境的平衡。在骨折愈合的早期及晚期均可检测到 T 细胞[9]。研究者通过比较有和没有成熟 T 细胞的动物的骨和骨折愈合,揭示了 T 细胞在决定组织矿化和骨质量中的重要作用[17]。除此之外,有研究通过单细胞 RNA 测序分析了来自股骨骨折不愈合患者的骨髓腔组织标本,发现不愈合标本组 T 细胞的比例较低[18]。上述研究均表明 T 细胞在整个愈合阶段的作用是不容忽视的。

然而,不同的 T 细胞亚群在骨折愈合中的作用不同。根据表面标记物及功能的不同,T 细胞可分为 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞。根据功能与分化状态分类,常见的有辅助 T 细胞(Th)、细胞毒性 T 细胞(CTL)、调节性 T 细胞(Treg)、组织驻留记忆 T 细胞(T_{rm})等。除此之外,还有一些特殊类型的 T 细胞: $\gamma\delta$ T 细胞、自然杀伤 T 细胞(NKT)、黏膜相关恒定 T 细胞(MAIT)等。

2.1.1. CD8⁺ T 细胞在骨折愈合中的作用机制

研究者通过骨折患者样本得出 CD8⁺效应 T 细胞(TEFF)减缓骨折愈合[19]。此外,研究还发现,小鼠截骨模型中 CD8⁺ T 细胞耗竭导致内源性骨再生增强,而 CD8⁺ T 细胞的重建损害了骨折愈合过程。

2.1.2. CD4⁺调节性 T 细胞在骨折愈合中的作用机制

CD4⁺调节性 T 细胞(TReg)是具有免疫调节功能的高度特化的细胞群,其特征表达表面标志物 CD25 和转录因子 Forkhead-Box-Protein P3 (FOXP3)。CD4⁺调节性 T 细胞通过多种途径发挥免疫调节作用,如:细胞-细胞接触依赖性和非细胞接触依赖性。有临床研究显示,骨折延迟愈合患者中调节性 T 细胞功能下调[20]。在此基础上,研究者通过小鼠截骨模型证实平衡的 TEFF/TReg 比例对骨再生有显著影响[21]。此外,外周血 CD8⁺ TEFF/CD4⁺ TReg 比值升高与骨愈合结局受损相关。通过对孤立性闭合性胫骨骨折患者进行数据分析,研究者表明 STAT3 可能通过增强 Treg 介导的对抗炎症的抑制而有益于骨折愈合[22]。进一步临床研究表明,淋巴细胞活化基因-3 分子(lymphocyte activation gene-3, LAG-3)是具有调节功能的 CD4⁺ T 细胞的标志物,同时,长骨折患者外周血中 LAG-3 + CD4⁺ T 细胞的表达与骨功能的恢复呈正相关[23]。还有研究团队提出 STAT3 可以用作鉴定其他骨折愈合的预后标志物。研究者基于 CD45RA 和 CD62L 的表达,将循环调节性 T 细胞分为 CD45RA + CD62L + 原初(N)、CD45RA-CD62L + 中枢记忆(CM)和 CD45RA-CD62L-效应记忆(EM)亚群。他们通过比较孤立性闭合性胫骨骨折患者中正常愈合组及延迟愈合组中调节性 T 细胞的亚群,发现 EM 调节性 T 细胞在骨折延迟愈合患者中表达降低,导致 RANK 抑制降低,从而促进骨吸收破骨细胞的分化,进而导致骨折延迟愈合[24]。双调蛋白(Amphiregulin)是骨痂调节性细胞中表达量最高的蛋白,它通过激活磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/PKB)信号通路,直接促进成骨前体细胞的增殖和分化,从而促进骨折愈合[25]。该研究表明调节性 T 细胞在骨折愈合中具有独特的作用,为临床治疗骨折提供了新的治疗靶点。在人类骨折患者及骨损伤小鼠模型中,有学者鉴定了具有由 CCR8 标记的骨修复能力的骨损伤响应性 Treg 亚群,并且揭示了 CCL1 增强了 CCR8 + Treg 细胞中碱性亮氨酸拉链 ATF 样转录因子(BATF)的表达水平,BATF 结合到 Grn 启动子并增加 Grn 翻译输出,然后增加颗粒蛋白前体(Progranulin, PGRN)(由颗粒蛋白(Grn)基因编码的蛋白质)的分泌,从而支持骨折后骨折愈合[26]。总之,以上研究表明并强调了操纵调节性 T 细胞信号传导以增强骨修复和再生的可能方法,为临床上骨折延迟愈合提供了新的观点与方法。

2.1.3. $\gamma\delta$ T 细胞在骨折愈合中的作用机制

$\gamma\delta$ T 细胞在骨折愈合中也发挥着积极作用。临床研究显示,双磷酸盐相关的颌骨坏死与人外周血 $\gamma\delta$ T 细胞亚群的缺乏有关[27]。动物实验表明,小鼠的股骨骨折可导致骨痂中 $\gamma\delta$ T 细胞的扩增,最终促进骨折愈合[28]。

在过去的几年中,肠道微生物组作为骨骼生物学调节器的作用已经非常明显。Dar 等人将阴道微生物组引入骨折愈合,并首次提出肠道微生物组部分调节骨折愈合的炎症阶段[28]。研究者表明,骨折增加了 S1PR1 介导的 Th17 细胞从肠中的排出,并通过 CCL20 介导的机制增强了它们向愈伤组织的归巢。阻断 S1P 减少了愈伤组织中的 T 细胞。然而,通过移植人体肠道分节丝状菌(Segmented Filamentous Bacteria, SFB)改变肠道微生物组增加了骨折愈合中的 Th17 及 $\gamma\delta$ T 细胞,从而促进骨痂形成、提高骨折修复率。

2.2. B 细胞在骨折愈合中的作用机制

B 细胞从普通的淋巴祖细胞分化,并通过产生抗体在获得性免疫应答的体液免疫中起作用。B 细胞作为适应性免疫系统中主要产生抗体的细胞,已经证实在多种疾病中均发挥至关重要的作用[29][30]。调节性 B 细胞可通过抑制慢性感染和自身免疫中过度的 T 细胞介导的炎症并在诱导炎症之前建立更抗炎的环境来直接促进免疫耐受的维持[31]。然而,调节性 B 细胞是否在维持适当的骨稳态和骨折愈合中起作用尚不清楚。临床研究表明 IL-10 产生的增加仅在正常愈合患者的整个愈合过程中持续,而在延迟愈合患者早期下调了 B 细胞 IL-10 分泌,并降低了调节性 B 细胞活性水平。从而表明了调节性 B 细胞在内源性骨再生过程中的作用。

2.3. T 细胞-基质细胞相互作用在骨折愈合中的机制研究

多能间充质干细胞(MSC),也成为间充质干细胞,具有分化为多种细胞类型的能力,包括:脂肪细胞、软骨细胞和骨细胞等[32][33]。MSC 最初从骨髓中分离,广泛存在于成人组织中,包括脑、胸腺、肺、肝、脾、肾和牙髓等[34]。MSC 具有影响先天性免疫系统及适应性免疫系统的显著且多样的免疫调节特性。关于适应性免疫系统,已经显示 MSC 通过经由细胞与细胞接触和各种可溶性因子的产生抑制效应 T 细胞(CD4⁺和 CD8⁺)的活化和增殖而具有直接免疫抑制特性[35]。最近引入的一个概念是“骨免疫调节”,其指的是使用各种策略改变免疫应答以增强骨修复[36]。在骨修复中,免疫细胞和 MSCs 之间的持续相互作用是决定骨折愈合成功的关键之一。

LIU 等人研究了受体 T 细胞在小鼠颅骨缺损中 MSC 介导的成骨中的作用。该研究表明,促炎性 T 细胞通过 IFN- γ 和 TNF- γ 释放抑制 MSC 诱导的骨形成[37]。IFN- γ 诱导了 runt 相关转录因子 2(Runx 2)途径的下调,并增强了 TNF- γ 调节的 MSC 凋亡。此外, TNF- α 通过抑制 NF- κ B 信号传导,将 IFN- κ B 激活的非凋亡 Fas 转化为 MSC 中的半胱天冬酶-8/3 相关凋亡信号,导致 MSC 凋亡。而使用全身性输注 T 细胞抑制性 Foxp3⁺调节性 T 细胞(TCFs)显著降低了 TNF- α 和 IFN- γ 的水平,并改善了 MSC 介导的骨再生和颅骨缺损修复。由于从老年人、患病个体和女性中分离的 MSC 具有较差的成骨潜力,因此使用从年轻健康男性中分离的同种异体 MSC 来增强这些人群中的骨修复是有利的。然而,在动物模型中进行的一些研究表明,由于受体宿主对移植的 MSC 的免疫应答,使用同种异体 MSC 是不可行的。然而,一项早期研究表明,与同基因对照组相比,在同种异体 MHC 错配小鼠皮下植入的 MSC 植入物中,宿主来源的 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞浸润的比例更大[38]。这表明,尽管自体 MSC 促进体内骨髓植入,但同种异体 MSC 本质上不是免疫豁免的。

2.4. 巨噬细胞在骨折愈合中的作用机制

骨折修复是一个复杂又高度组织化的过程,涉及各种细胞类型与细胞外环境之间的相互作用。不同于大多数组织损伤形成瘢痕的愈合过程,骨折愈合导致新骨的形成[39]。骨折愈合开始的特征是炎性细胞向骨折部位的浸润,这些炎性细胞还分泌多种细胞因子和生长因子,其对指导新血管形成[40]和细胞募集[41]至关重要。在所有的免疫细胞中,巨噬细胞已经被广泛地研究。巨噬细胞是炎症期间大量存在的单核

细胞谱系的细胞。巨噬细胞根据其极化状态和功能不同分为 M1 和 M2 表型, 分别其促炎和抗炎的作用。M1 通过分泌: IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、活性氧(ROS)等促进炎症反应[42]。M2 通过分泌 IL-10 和 TGF- β 等抑制炎症反应[42] [43]。M2 巨噬细胞进一步被表征为 M2a~M2d, 每个亚群分泌或表达独特的蛋白质, 具有其独特的功能。其他表征的巨噬细胞群包括: 破骨细胞、树突细胞(DC)、滑膜巨噬细胞等。破骨细胞由单核/巨噬细胞前体分化而来, 受 RANKL/M-CSF 调控, 主要介导骨吸收、参与骨重塑平衡。树突细胞为组织驻留巨噬细胞, 又称之为骨组织巨噬细胞[44]。滑膜巨噬细胞位于关节滑膜中, M1 型加重滑膜炎和软骨破坏, M2 型促进修复。

2.5. 巨噬细胞极化在骨折愈合中的研究进展

目前, 虽然外科技术及材料学发展迅速, 但骨折不愈合及延迟愈合问题仍然突出[45]。骨折创伤激活组织驻留巨噬细胞, 其促进炎症并募集多余的组织驻留巨噬细胞到骨折部位并在骨折愈合的多个阶段发挥作用[46]。不同极化的群体在骨折愈合过程中具有不同但互补的作用。在骨折愈合过程中, 巨噬细胞在骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)的募集和分化中起重要作用, 其分泌的骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等物质有利于促进受伤部位骨组织的愈合[47]。在骨折后炎症期, M1 型巨噬细胞分泌炎症细胞因子, 如白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和肿瘤坏死因子- α , 激活免疫系统, 吞噬坏死细胞和组织碎片; 而 M2 型巨噬细胞主要在骨折愈合中晚期通过分泌转化生长因子(transform growth factor, TGF)- β 、IL-10、VEGF, 促进组织修复, 加快愈合[48]。研究发现用 1,25-二羟基维生素 D 抑制 M1 极化从而减少了小鼠骨折部位的促炎因子, 减少了 MSC 向骨折部位的募集, 并损害了骨愈合[49]。此外, 体外研究也证实 M1 巨噬细胞促进 MSC 的成骨分化, 再次表明了 M1 巨噬细胞在骨折愈合中的积极作用。同样, M2 巨噬细胞对骨折愈合也发挥着重要作用。SCHLUNDT 等人用 IL-4 和 IL-13 的胶原支架处理小鼠以增加 M2 巨噬细胞群, 并发现骨折愈合得到改善[49]。然而, 尽管极化细胞群对骨折愈合具有重要意义, 但其在愈合中的变化还没有得到很好的描述。研究者通过小鼠股骨骨折进行分析发现 M1 和 M2 亚型和 DC 在修复过程的早期被招募到骨折部位, 因此可能协同工作, 以调节炎症反应, 从而招募修复后期所需的成骨细胞[50]。

2.6. 巨噬细胞 - 骨髓干细胞在骨折愈合中的作用机制

近年来, 巨噬细胞在骨折愈合过程中通过成骨途径调控骨髓干细胞(BMSC)的分化作用受到广泛关注。通过小鼠胫骨单皮质缺损模型, 研究者证明巨噬细胞清道夫受体 1(MSR1)介导 PI3K/AKT/GSK3 β / β -catenin 信号通路进而激活增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1- α (PGC1 α)。该通路通过增强线粒体氧化磷酸化促进 M2 样极化, 从而促进 BMSCs 的成骨分化能力[51]。在临床前小鼠肌肉骨骼创伤性损伤(MTI)模型中, 免疫细胞和 SSPC 的损伤反应被破坏导致促炎期延长和炎症消退延迟, 而使用 CSF1R 抑制剂可改善愈合。这些发现揭示了巨噬细胞以及骨髓干细胞作为骨愈合的驱动力[52]。Raggatt 等人使用鼠股骨骨折模型探究了巨噬细胞的分布、表型和在软骨内骨痂形成的机制, 从而表明炎症性巨噬细胞是骨折修复启动所必需的, 而炎症性巨噬细胞和驻留巨噬细胞在软骨内骨痂形成过程中均促进合成代谢机制[53]。不同的巨噬细胞耗竭策略已经证明巨噬细胞在骨折愈合中的重要作用, 但其潜在分子机制尚不清楚。Pierre 等人使用小鼠胫骨损伤模型发现巨噬细胞产物制瘤素 M (OSM)通过 OSMR 和 STAT3 的信号传导, 作用于骨髓间充质祖细胞的募集、增殖和/或成骨细胞分化, 维持膜内骨形成[54]。

综上所述, 巨噬细胞对骨折愈合做出了长期且具有实质性的贡献, 可以作为增强修复的治疗靶点。因此, 巨噬细胞是开发促代谢骨折治疗的可行靶点, 具有潜在的广泛治疗前景。赋予骨生物材料良好的骨免疫调节特性可能是开发或改良先进骨生物材料的一种非常有价值的策略。

3. 中性粒细胞在骨折愈合中的作用

当骨折发生时,中性粒细胞最先达到损伤部位,释放多种炎性因子及趋化因子,募集巨噬细胞、肥大细胞等多种免疫细胞[55]。中性粒细胞是全身免疫应答的关键效应细胞,代表了早期骨折血肿中最丰富的免疫细胞群。骨折发生后,中性粒细胞在几分钟内迁徙到受损组织,由 C-X-C 基序配体(CXCL) 1-3、巨噬细胞炎性蛋白-1 α 、C5a 和白三烯 B4 等募集,以清除骨折部位的骨折碎片和病原体[56]。然而,中性粒细胞在骨折愈合中的机制尚不清楚。根据对炎症的影响,中性粒细胞可分为两种亚型:具有肿瘤抑制作用的促炎性中性粒细胞(N1)和具有肿瘤促进作用的抗炎性中性粒细胞(N2)[57]。在骨折损伤反应中,中性粒细胞和相关血浆细胞外囊泡(EV)在骨折骨痂中的表达显著高于外周血。通过异时联体将老年小鼠暴露于年轻循环中增加了中性粒细胞及其相关 Ly6G+血浆 EV 的数量,明显改善老年小鼠的骨折愈合[58]。此外,有学者向肌肉植入白细胞介素-8 (IL-8)表明一定水平的 IL-8 募集中性粒细胞到植入部位并被 N2 化,然后通过 SDF-1/CXCR4 (C-X-C 基序趋化因子受体 4)轴及其下游磷脂酰肌醇 3'-激酶(PI3K)/Akt 通路和 β -连环蛋白介导的迁移分泌基质细胞衍生因子-1 β (SDF-1 β)用于骨髓间充质干细胞(BMSC)的趋化,最终促进异位软骨内骨化[59]。

4. 肥大细胞在骨折愈合中的作用

肥大细胞(MC)是组织驻留的造血细胞并在其分泌颗粒中储存广泛的预先形成的炎症介质,包括组胺、肝素、TNF 和 IL-6 以及各种趋化因子和蛋白酶,其可以在激活时快速释放[60]。然而,肥大细胞在骨折愈合中的功能尚不清楚。研究人员表明大鼠胫骨骨折模型中骨膜骨痂中的 MC 进行性增加。同时,其他研究人员也证实了这一观点,他们发现血管周围的早期软骨痂中 MC 数量增加。在 MC 缺陷小鼠模型中的研究也揭示了骨再生的受损。然而,该项研究使用的 c-Kit 携带 c-Kit 基因改变的 MC 缺陷小鼠模型有一个关键缺点是其免疫细胞群和破骨细胞也受到严重影响。因此,Kroner 等人使用一种新的 c-Kit 非依赖性肥大细胞缺乏小鼠模型,他们证明肥大细胞不影响生理性转换。然而,它们通过诱导炎症介质的释放和先天免疫细胞的募集而引发骨折后的局部和全身炎症。在愈合后期,肥大细胞聚集并调节破骨细胞活性以重塑骨折骨痂。综上所述,肥大细胞是治疗炎性骨疾病的潜在靶点,有望成为治疗骨折延迟愈合的重要治疗靶点。

5. 免疫细胞在骨折愈合中的生物学应用

生物材料植入物对宿主免疫反应产生深远的影响,从而显著影响骨折愈合和修复的过程。研究已经发现免疫应答在骨生物材料刺激的骨生成中起关键作用[61]-[63]。研究者通过使用广泛培养的干细胞植入 β -磷酸三钙(β -TCP)支架到大鼠股骨大尺寸节段性骨缺损中的基于细胞的治疗导致缺损部位血管化和新骨形成的改善。然而,尽管该方法有效。但长期培养祖细胞的使用可能具有生物安全问题等,并且目前尚未在临床使用。巨噬细胞是植入物反应中的主要效应细胞,是骨生成不可或缺的,其异质性和可塑性使巨噬细胞成为免疫系统调节的主要靶细胞。研究人员使用 b-磷酸三钙(b-TCP)作为模型生物材料,以研究巨噬细胞在材料刺激的骨生成中的作用[64]。研究表明,b-磷酸钙提取物诱导巨噬细胞激活钙感受器(CaSR)通路,骨形态发生蛋白 2 (BMP2)在 b-TCP 刺激下也显著上调,促进巨噬细胞向 M2 型改变,从而促进成骨过程。此外,当巨噬细胞条件化的 b-TCP 提取物应用于骨髓间充质干细胞(BMSCs)时,BMSCs 的成骨分化显著增强。在此基础上,研究者开发 Mg- β -TCP 支架,该支架可使巨噬细胞转变为 M2 极端表型[36]。与此同时,Mg- β -TCP 支架促进巨噬细胞中 VEGF 和 BMP2 显著上调,表明 b-TCP 修饰的 Mg 支架中的巨噬细胞具有促成骨特性。巨噬细胞介导的骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)成骨分化进一步证实了这一点。Mg- β -TCP 支架上培养的巨噬细胞条件培养液刺激 BMSCs 后,BMSCs 的

成骨分化明显增强,破骨细胞分化受到抑制,表现为 MCSF、TRAP 表达下调, RANKL/RANK 系统表达受抑制。然而,该研究目前尚处于动物实验阶段,尚未用于临床。

为了有效地提供免疫药物、细胞或细胞因子,选择合适的载体是至关重要的。水凝胶因其低侵入性、可注射性、包封物质的控释释放和无毒降解等优势引起了人们极大地兴趣[65]。IL-4 作为关键的免疫调节因子,已经引起广泛关注。研究者证明使用水凝胶系统递送 IL-4 可促进骨折后骨愈合[66]。Zhang 等[67]进一步证明,负载 IL-4 的钙富集胶质水凝胶支架(Ca-GG + IL-4)通过诱导 M2 巨噬细胞极化,激活 TGF- β 1/SMAD 通路,促进骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化,并减少细胞凋亡,显著改善下颌骨缺损修复效果。此外,ZOU 等人[68]利用氧化石墨烯(GO)-羧甲基壳聚糖(CMC)/聚(乙二醇)二丙烯酸酯(PEGDA)开发了互穿网络水凝胶,其中以可控的方式负载和释放两种生物活性分子,白细胞介素-4(IL-4)和骨形态发生蛋白-2(BMP-2),以诱导巨噬细胞分化为 M2 型并促进骨形成。

有研究学者提出骨髓单核细胞(BMC)可以在数小时内采集并重新引入患者体内,这更符合快速确定骨折固定的临床要求。动物研究发现, BMCs 与 β -TCP 支架的组合增强了大鼠股骨缺损模型的骨愈合反应[69]。因此,研究人员在一项 I 期临床试验中研究了术前分离的自体 BMC 细胞接种到 β -TCP 上联合角度稳定固定(Philos plate[®])治疗肱骨近端骨折(PHF)的安全性和可行性。该研究表明用 BMC 强化 β -磷酸三钙治疗肱骨近端骨折患者所有骨折均在观察时间内愈合,无继发脱位,并且该研究具有可行性与安全性,未观察到局部或全身反应。在另一项研究中,Krieger 等人证明,使用 PEG-DA 水凝胶递送基质衍生因子-1 α (SDF-1 α)刺激了抗炎单核细胞的趋化性并支持微血管网络的生长,从而有助于骨折愈合[70]。

6. 讨论

严重创伤、骨质疏松后骨折、假关节或骨髓炎清创后的骨折由于血管受损,骨折延迟愈合或不愈合仍然是骨科治疗的挑战。人们越来越认识到免疫系统和骨骼系统之间错综复杂的联系,并将骨免疫学这一概念引入这一领域[71]。自体移植骨是增加骨再生的“金标准”,但经常有相关并发症的报道[72]。除此之外,同种异体细胞治疗的免疫排斥。同种异体间充质干细胞(MSC)易被宿主 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞识别并清除,限制了其临床应用因此,应用细胞疗法治疗骨折不愈合或延迟愈合是传统自体骨移植的一种很有前景的替代方法。尽管对于适应性免疫及巨噬细胞在骨折愈合中的具体机制研究已经引起了广泛关注,但仍需进一步探索其参与骨折愈合的具体机制,拟为临床治疗提供新的治疗靶点。

T 细胞在骨折愈合中的作用存在显著研究差异。Reinke 等[19]发现 CD8⁺效应 T 细胞(TEFF)通过分泌促炎因子抑制骨再生,而 Dar 等[28]在肠道微生物组调控的模型中观察到 $\gamma\delta$ T 细胞通过促进 Th17 细胞归巢显著加速愈合。这种矛盾可能源于实验模型的差异: Reinke 使用人源化小鼠模型,而 Dar 采用无菌小鼠结合微生物组移植,提示微环境因素(如肠道菌群)可能显著影响 T 细胞功能。调节性 T 细胞(Treg)通过调控 Treg/Teff 比值、增强 CCR8⁺ Treg 功能或促进双调蛋白(Amphiregulin)分泌,显著促进骨再生[20][21][26]。TEFF/Treg 比值可能是骨愈合的预测性生物标志物。此外,Avin 等通过单细胞测序发现,骨折不愈合患者骨髓中 T 细胞比例显著降低,但未明确 T 细胞亚群的具体作用机制。需进一步结合谱系追踪技术和条件性基因敲除模型,以区分不同 T 细胞亚群在时空动态中的功能。

巨噬细胞极化的研究多聚焦于 M1/M2 二分法,但最新分类(如 M2a~d 亚型)提示更复杂的调控网络。Zhao 等[51]发现 MSR1/PI3K/AKT 通路通过增强线粒体氧化磷酸化驱动 M2 极化,而 Wasnik 等[49]证明维生素 D 抑制 M1 极化但意外损害骨愈合,提示 M1 在早期炎症阶段的必要性。这些矛盾表明,单纯抑制 M1 或促进 M2 可能破坏修复阶段的动态平衡。Hachemi 等[52]的多组学分析进一步揭示,巨噬细胞亚群与 BMSC 的代谢互作(如乳酸分泌)是成骨分化的关键,但相关机制仍需验证。巨噬细胞极化(M1/M2)通过 MSR1/PI3K/AKT 通路调控骨髓间充质干细胞(BMSC)成骨分化,为代谢调控疗法提供新方向[51]。然

而,不同免疫细胞亚群(如 T 细胞亚群、M1/M2 巨噬细胞)在愈合阶段的动态相互作用尚未完全解析,靶向调控易引发脱靶效应。肠道微生物组通过调节 Th17 和 $\gamma\delta$ T 细胞功能,间接增强骨痂形成与骨折修复,为微生物组干预策略奠定理论基础。然而,微生物组相关的副作用应当进一步研究。

中性粒细胞的作用长期被低估,但 Cai 等[59]发现 N2 中性粒细胞通过 SDF-1/CXCR4 轴招募 BMSC,而 Zhang 等[58]证实老年小鼠中性粒细胞衰老导致 EVs 功能受损,补充年轻 EVs 可恢复愈合能力。然而,中性粒细胞亚型(N1/N2)的标记物尚未统一,Quail 等[57]提出的“中性粒细胞可塑性”概念提示需开发单细胞水平的动态追踪技术。

最近,具有免疫调节特性的生物材料已经成为骨组织生物学工程的重要新平台。负载 IL-4 或 BMP-2 的水凝胶支架通过诱导 M2 巨噬细胞极化或激活 TGF- β 1/SMAD 通路,显著改善骨缺损修复效果[67][68]。 β -TCP 修饰的镁支架(Mg- β -TCP)通过调控巨噬细胞促成骨表型,增强骨生成[36][64]。然而,巨噬细胞极化调控、生物材料植入可能引发全身免疫失衡或局部炎症反应,需长期随访验证[49][52]。BMC 已经应用于心脏病学以及血管外科手术,并且由于其明显的再生潜力及安全性,非常适合再生医学[73]。自体骨髓单核细胞(BMC)联合 β -TCP 支架在临床中显示出安全性与可行性,为骨折延迟愈合提供新型治疗方案[69]。然而,个体化治疗的技术瓶颈。免疫状态受年龄、基础疾病(如糖尿病)及微生物组多样性影响,需开发精准调控策略[4][20]。

7. 不足与挑战

Treg 与 TEFF 的平衡可能通过调控巨噬细胞极化间接影响成骨。例如,Chen 等[26]发现 CCR8+ Treg 通过分泌颗粒蛋白前体(PGRN)激活 BMSC 成骨分化,而 TEFF 可能通过 IFN- γ 抑制此过程。未来研究可探索靶向 Treg-TEFF/巨噬细胞轴的双重调控策略,例如开发 CCL1/CCR8 激动剂联合 IL-4 递送系统,同时增强 Treg 功能并诱导 M2 巨噬细胞极化。靶向巨噬细胞代谢重编程(如通过二甲双胍调控 AMPK 通路)可能优化其极化状态。此外,生物材料设计可结合时空控释技术。此类策略需在大型动物模型(如羊或猪)中验证其安全性和长期效果。联合靶向中性粒细胞衰老和微生物组干预可能协同增强骨再生。此外,肥大细胞稳定剂(如色甘酸钠)在骨折早期应用的潜力值得探索。此外,未来可设计“智能”材料,通过微环境响应性释放(如 pH 或 ROS 敏感型水凝胶)动态调节免疫细胞行为。

现有研究揭示了免疫细胞在骨折愈合中的复杂网络,但多数机制仍局限于小鼠模型,临床转化面临挑战。未来需重点关注:多组学整合:结合单细胞转录组、代谢组和空间转录组,解析免疫-基质-微生物组互作的全景图谱;精准调控:开发基于患者免疫状态(如 Treg/TEFF 比值或肠道菌群特征)的个体化治疗策略;转化瓶颈突破:优化生物材料的免疫相容性,并通过大型动物实验验证长期安全性。总之,骨免疫学为骨折治疗提供了全新视角,但需跨学科合作以攻克机制解析与临床应用的鸿沟。

8. 总结

骨折愈合是一个连续过程,在这个愈合期间免疫细胞、巨噬细胞和适应性免疫在骨折愈合中协同作用,巨噬细胞极化、T 细胞平衡及 RANKL 信号是关键调控点。细胞疗法和组织工程通过调控免疫微环境和提供再生支持,显著提升骨修复效率。未来,深入解析骨免疫学机制,结合精准免疫调控和先进生物材料,有望实现复杂骨折的高效治疗,为临床骨科带来新突破。

参考文献

- [1] GBD 2019 Mental Disorders Collaborators (2021) Global, Regional, and National Burden of Bone Fractures in 204 Countries and Territories, 1990-2019: A Systematic Analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Healthy Longevity*, 2, e580-e592. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(21\)00395-3](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(21)00395-3)

- [2] Walter, N., Hierl, K., Brochhausen, C., Alt, V. and Rupp, M. (2022) The Epidemiology and Direct Healthcare Costs of Aseptic Nonunions in Germany—A Descriptive Report. *Bone & Joint Research*, **11**, 541-547. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.118.bjr-2021-0238.r3>
- [3] SK, S. (2019) Fracture Non-Union: A Review of Clinical Challenges and Future Research Needs. *Malaysian Orthopaedic Journal*, **13**, 1-10. <https://doi.org/10.5704/moj.1907.001>
- [4] Wildemann, B., Ignatius, A., Leung, F., Taitsman, L.A., Smith, R.M., Pesántez, R., et al. (2021) Non-Union Bone Fractures. *Nature Reviews Disease Primers*, **7**, Article No. 57. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00289-8>
- [5] Loeffler, J., Duda, G.N., Sass, F.A. and Dienelt, A. (2018) The Metabolic Microenvironment Steers Bone Tissue Regeneration. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **29**, 99-110. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.11.008>
- [6] Schmidt-Bleek, K., Petersen, A., Dienelt, A., Schwarz, C. and Duda, G.N. (2014) Initiation and Early Control of Tissue Regeneration—Bone Healing as a Model System for Tissue Regeneration. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **14**, 247-259. <https://doi.org/10.1517/14712598.2014.857653>
- [7] Baht, G.S., Vi, L. and Alman, B.A. (2018) The Role of the Immune Cells in Fracture Healing. *Current Osteoporosis Reports*, **16**, 138-145. <https://doi.org/10.1007/s11914-018-0423-2>
- [8] El-Jawhari, J.J., Jones, E. and Giannoudis, P.V. (2016) The Roles of Immune Cells in Bone Healing; What We Know, Do Not Know and Future Perspectives. *Injury*, **47**, 2399-2406. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2016.10.008>
- [9] Könnecke, I., Serra, A., El Khassawna, T., Schlundt, C., Schell, H., Hauser, A., et al. (2014) T and B Cells Participate in Bone Repair by Infiltrating the Fracture Callus in a Two-Wave Fashion. *Bone*, **64**, 155-165. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.03.052>
- [10] Schlundt, C., El Khassawna, T., Serra, A., Dienelt, A., Wendler, S., Schell, H., et al. (2018) Macrophages in Bone Fracture Healing: Their Essential Role in Endochondral Ossification. *Bone*, **106**, 78-89. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.10.019>
- [11] Toben, D., Schroeder, I., El Khassawna, T., Mehta, M., Hoffmann, J., Frisch, J., et al. (2010) Fracture Healing Is Accelerated in the Absence of the Adaptive Immune System. *Journal of Bone and Mineral Research*, **26**, 113-124. <https://doi.org/10.1002/jbmr.185>
- [12] Xiao, W., Hu, Z., Li, T. and Li, J. (2017) Bone Fracture Healing Is Delayed in Splenectomic Rats. *Life Sciences*, **173**, 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.12.005>
- [13] Richardson, J., Hill, A.M., Johnston, C.J.C., McGregor, A., Norrish, A.R., Eastwood, D., et al. (2008) Fracture Healing in HIV-Positive Populations. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, **90**, 988-994. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.90b8.20861>
- [14] Dimitriou, R., Tsiridis, E., Carr, I., Simpson, H. and Giannoudis, P.V. (2006) The Role of Inhibitory Molecules in Fracture Healing. *Injury*, **37**, S20-S29. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2006.02.039>
- [15] Opal, S.M. (2000) Phylogenetic and Functional Relationships between Coagulation and the Innate Immune Response. *Critical Care Medicine*, **28**, S77-S80. <https://doi.org/10.1097/00003246-200009001-00017>
- [16] Okamoto, K. and Takayanagi, H. (2018) Osteoimmunology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **9**, a031245. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031245>
- [17] El Khassawna, T., Serra, A., Bucher, C.H., Petersen, A., Schlundt, C., Könnecke, I., et al. (2017) T Lymphocytes Influence the Mineralization Process of Bone. *Frontiers in Immunology*, **8**, Article 562. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00562>
- [18] Avin, K.G., Dominguez, J.M., Chen, N.X., Hato, T., Myslinski, J.J., Gao, H., et al. (2022) Single-Cell Rnaseq Provides Insight into Altered Immune Cell Populations in Human Fracture Nonunions. *Journal of Orthopaedic Research*, **41**, 1060-1069. <https://doi.org/10.1002/jor.25452>
- [19] Reinke, S., Geissler, S., Taylor, W.R., Schmidt-Bleek, K., Juelke, K., Schwachmeyer, V., et al. (2013) Terminally Differentiated CD8⁺ T Cells Negatively Affect Bone Regeneration in Humans. *Science Translational Medicine*, **5**, 177ra36. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004754>
- [20] Jiang, H., Ti, Y., Wang, Y., Wang, J., Chang, M., Zhao, J., et al. (2017) Downregulation of Regulatory T Cell Function in Patients with Delayed Fracture Healing. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **45**, 430-436. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12902>
- [21] Schlundt, C., Reinke, S., Geissler, S., Bucher, C.H., Giannini, C., Märdian, S., et al. (2019) Individual Effector/Regulator T Cell Ratios Impact Bone Regeneration. *Frontiers in Immunology*, **10**, Article 1954. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01954>
- [22] Sun, G., Wang, Z., Ti, Y., Wang, Y., Wang, J., Zhao, J., et al. (2017) STAT3 Promotes Bone Fracture Healing by Enhancing the FOXP3 Expression and the Suppressive Function of Regulatory T Cells. *APMIS*, **125**, 752-760. <https://doi.org/10.1111/apm.12706>

- [23] Wang, J., Ti, Y., Wang, Y., Guo, G., Jiang, H., Chang, M., Qian, H., Zhao, J. and Sun, G. (2018) LAG-3 Represents a Marker of CD4⁺ T Cells with Regulatory Activity in Patients with Bone Fracture. *Immunological Investigations*, **47**, 492-503.
- [24] Wang, J., Jiang, H., Qiu, Y., Wang, Y., Sun, G. and Zhao, J. (2019) Effector Memory Regulatory T Cells Were Most Effective at Suppressing RANKL but Their Frequency Was Downregulated in Tibial Fracture Patients with Delayed Union. *Immunology Letters*, **209**, 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.03.018>
- [25] Wu, T., Wang, L., Jian, C., Zhang, Z., Zeng, R., Mi, B., *et al.* (2024) A Distinct “Repair” Role of Regulatory T Cells in Fracture Healing. *Frontiers of Medicine*, **18**, 516-537. <https://doi.org/10.1007/s11684-023-1024-8>
- [26] Chen, R., Zhang, X., Li, B., Tonetti, M.S., Yang, Y., Li, Y., *et al.* (2024) Progranulin-Dependent Repair Function of Regulatory T Cells Drives Bone-Fracture Healing. *Journal of Clinical Investigation*, **135**, e180679. <https://doi.org/10.1172/jci180679>
- [27] Kalyan, S. (2016) It May Seem Inflammatory, but Some T Cells Are Innately Healing to the Bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, **31**, 1997-2000. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2875>
- [28] Dar, H.Y., Perrien, D.S., Pal, S., Stoica, A., Uppuganti, S., Nyman, J.S., *et al.* (2023) Callus $\gamma\delta$ T Cells and Microbe-Induced Intestinal Th17 Cells Improve Fracture Healing in Mice. *Journal of Clinical Investigation*, **133**, e166577. <https://doi.org/10.1172/jci166577>
- [29] Mauri, C. and Bosma, A. (2012) Immune Regulatory Function of B Cells. *Annual Review of Immunology*, **30**, 221-241. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074934>
- [30] Yoshizaki, A., Miyagaki, T., DiLillo, D.J., Matsushita, T., Horikawa, M., Kountikov, E.I., *et al.* (2012) Regulatory B Cells Control T-Cell Autoimmunity through IL-21-Dependent Cognate Interactions. *Nature*, **491**, 264-268. <https://doi.org/10.1038/nature11501>
- [31] Das, A., Ellis, G., Pallant, C., Lopes, A.R., Khanna, P., Peppas, D., *et al.* (2012) IL-10-Producing Regulatory B Cells in the Pathogenesis of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *The Journal of Immunology*, **189**, 3925-3935. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103139>
- [32] Barry, F.P. and Murphy, J.M. (2004) Mesenchymal Stem Cells: Clinical Applications and Biological Characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **36**, 568-584. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.11.001>
- [33] Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., *et al.* (1999) Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, **284**, 143-147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- [34] Demircan, P.C., Sariboyaci, A.E., Unal, Z.S., Gacar, G., Subasi, C. and Karaoz, E. (2011) Immunoregulatory Effects of Human Dental Pulp-Derived Stem Cells on T Cells: Comparison of Trans Well Co-Culture and Mixed Lymphocyte Reaction Systems. *Cytotherapy*, **13**, 1205-1220.
- [35] Klyushnenkova, E., Mosca, J.D., Zernetkina, V., Majumdar, M.K., Beggs, K.J., Simonetti, D.W., *et al.* (2005) T Cell Responses to Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cells: Immunogenicity, Tolerance, and Suppression. *Journal of Biomedical Science*, **12**, 47-57. <https://doi.org/10.1007/s11373-004-8183-7>
- [36] Chen, Z., Mao, X., Tan, L., Friis, T., Wu, C., Crawford, R., *et al.* (2014) Osteoimmunomodulatory Properties of Magnesium Scaffolds Coated with β -Tricalcium Phosphate. *Biomaterials*, **35**, 8553-8565. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.038>
- [37] Liu, H., Zhang, J., Liu, C., Hayashi, Y. and Kao, W.W.-Y. (2012) Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Can Differentiate and Assume Corneal Keratocyte Phenotype. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **16**, 1114-1124. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01418.x>
- [38] Eliopoulos, N., Stagg, J., Lejeune, L., Pommey, S. and Galipeau, J. (2005) Allogeneic Marrow Stromal Cells Are Immune Rejected by MHC Class I- and Class II-Mismatched Recipient Mice. *Blood*, **106**, 4057-4065. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1004>
- [39] Arvidson, K., Abdallah, B.M., Applegate, L.A., Baldini, N., Cenni, E., Gomez-Barrena, E., *et al.* (2011) Bone Regeneration and Stem Cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **15**, 718-746. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01224.x>
- [40] Street, J., Bao, M., deGuzman, L., Bunting, S., Peale, F.V., Ferrara, N., *et al.* (2002) Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates Bone Repair by Promoting Angiogenesis and Bone Turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 9656-9661. <https://doi.org/10.1073/pnas.152324099>
- [41] Gerstenfeld, L.C., Cullinane, D.M., Barnes, G.L., Graves, D.T. and Einhorn, T.A. (2003) Fracture Healing as a Post-natal Developmental Process: Molecular, Spatial, and Temporal Aspects of Its Regulation. *Journal of Cellular Biochemistry*, **88**, 873-884. <https://doi.org/10.1002/jcb.10435>
- [42] Martinez, F.O. and Gordon, S. (2014) The M1 and M2 Paradigm of Macrophage Activation: Time for Reassessment. *F1000Prime Reports*, **6**, Article 13. <https://doi.org/10.12703/p6-13>

- [43] Röszer, T. (2015) Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of Inflammation*, **2015**, Article 816460. <https://doi.org/10.1155/2015/816460>
- [44] Alnaeeli, M., Park, J., Mahamed, D., Penninger, J.M. And Teng, Y.T. (2007) Dendritic Cells at the Osteo-Immune Interface: Implications for Inflammation-Induced Bone Loss. *Journal of Bone and Mineral Research*, **22**, 775-780.
- [45] Blank, R.D. (2019) Practical Management of Fracture Risk among Peri- and Postmenopausal Women. *Fertility and Sterility*, **112**, 782-790. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.09.038>
- [46] Alexander, K.A., Chang, M.K., Maylin, E.R., Kohler, T., Muller, R., Wu, A.C., Van Rooijen, N., Sweet, M.J., Hume, D.A., Raggatt, L.J., et al. (2011) Osteal Macrophages Promote *in Vivo* Intramembranous Bone Healing in a Mouse Tibial Injury Model. *Journal of Bone and Mineral Research*, **26**, 1517-1532.
- [47] Pajarinen, J., Lin, T., Gibon, E., Kohno, Y., Maruyama, M., Nathan, K., et al. (2019) Mesenchymal Stem Cell-Macrophage Crosstalk and Bone Healing. *Biomaterials*, **196**, 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.12.025>
- [48] Shin, R.L., Lee, C., Shen, O.Y., Xu, H. and Lee, O.K. (2021) The Crosstalk between Mesenchymal Stem Cells and Macrophages in Bone Regeneration: A Systematic Review. *Stem Cells International*, **2021**, Article 8835156. <https://doi.org/10.1155/2021/8835156>
- [49] Wasnik, S., Rundle, C.H., Baylink, D.J., Yazdi, M.S., Carreon, E.E., Xu, Y., et al. (2018) 1,25-Dihydroxyvitamin D Suppresses M1 Macrophages and Promotes M2 Differentiation at Bone Injury Sites. *JCI Insight*, **3**, e98773. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98773>
- [50] McCauley, J., Bitsaktsis, C. and Cottrell, J. (2020) Macrophage Subtype and Cytokine Expression Characterization during the Acute Inflammatory Phase of Mouse Bone Fracture Repair. *Journal of Orthopaedic Research*, **38**, 1693-1702. <https://doi.org/10.1002/jor.24603>
- [51] Zhao, S., Kong, F., Jie, J., Li, Q., Liu, H., Xu, A., et al. (2020) Macrophage MSR1 Promotes BMSC Osteogenic Differentiation and M2-Like Polarization by Activating PI3K/AKT/Gsk3 β / β -Catenin Pathway. *Theranostics*, **10**, 17-35. <https://doi.org/10.7150/thno.36930>
- [52] Hachemi, Y., Perrin, S., Ethel, M., Julien, A., Vettese, J., Geisler, B., et al. (2024) Multimodal Analyses of Immune Cells during Bone Repair Identify Macrophages as a Therapeutic Target in Musculoskeletal Trauma. *Bone Research*, **12**, Article No. 56. <https://doi.org/10.1038/s41413-024-00347-3>
- [53] Raggatt, L.J., Wulschleger, M.E., Alexander, K.A., Wu, A.C.K., Millard, S.M., Kaur, S., et al. (2014) Fracture Healing via Periosteal Callus Formation Requires Macrophages for Both Initiation and Progression of Early Endochondral Ossification. *The American Journal of Pathology*, **184**, 3192-3204. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.08.017>
- [54] Guihard, P., Boutet, M., Brounais-Le Royer, B., Gamblin, A., Amiaud, J., Renaud, A., et al. (2015) Oncostatin M, an Inflammatory Cytokine Produced by Macrophages, Supports Intramembranous Bone Healing in a Mouse Model of Tibia Injury. *The American Journal of Pathology*, **185**, 765-775. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.11.008>
- [55] Gu, Q., Yang, H. and Shi, Q. (2017) Macrophages and Bone Inflammation. *Journal of Orthopaedic Translation*, **10**, 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2017.05.002>
- [56] Furze, R.C. and Rankin, S.M. (2008) Neutrophil Mobilization and Clearance in the Bone Marrow. *Immunology*, **125**, 281-288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02950.x>
- [57] Quail, D.F., Amulic, B., Aziz, M., Barnes, B.J., Eruslanov, E., Fridlender, Z.G., et al. (2022) Neutrophil Phenotypes and Functions in Cancer: A Consensus Statement. *Journal of Experimental Medicine*, **219**, e20220011. <https://doi.org/10.1084/jem.20220011>
- [58] Zhang, X., Baht, G.S., Huang, R., Chen, Y., Molitoris, K.H., Miller, S.E., et al. (2022) Rejuvenation of Neutrophils and Their Extracellular Vesicles Is Associated with Enhanced Aged Fracture Healing. *Aging Cell*, **21**, e13651. <https://doi.org/10.1111/acer.13651>
- [59] Cai, B., Lin, D., Li, Y., Wang, L., Xie, J., Dai, T., et al. (2021) N2-Polarized Neutrophils Guide Bone Mesenchymal Stem Cell Recruitment and Initiate Bone Regeneration: A Missing Piece of the Bone Regeneration Puzzle. *Advanced Science*, **8**, Article 2100584. <https://doi.org/10.1002/advs.202100584>
- [60] Wernersson, S. and Pejler, G. (2014) Mast Cell Secretory Granules: Armed for Battle. *Nature Reviews Immunology*, **14**, 478-494. <https://doi.org/10.1038/nri3690>
- [61] Seebach, C., Henrich, D., Kähling, C., Wilhelm, K., Tami, A.E., Alini, M., et al. (2010) Endothelial Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells Seeded Onto β -TCP Granules Enhance Early Vascularization and Bone Healing in a Critical-Sized Bone Defect in Rats. *Tissue Engineering Part A*, **16**, 1961-1970. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0715>
- [62] Henrich, D., Seebach, C., Kaehling, C., Scherzed, A., Wilhelm, K., Tewksbury, R., et al. (2009) Simultaneous Cultivation of Human Endothelial-Like Differentiated Precursor Cells and Human Marrow Stromal Cells on β -Tricalcium Phosphate. *Tissue Engineering Part C: Methods*, **15**, 551-560. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0385>
- [63] Usami, K., Mizuno, H., Okada, K., Narita, Y., Aoki, M., Kondo, T., et al. (2008) Composite Implantation of

- Mesenchymal Stem Cells with Endothelial Progenitor Cells Enhances Tissue-Engineered Bone Formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **90**, 730-741. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32142>
- [64] Chen, Z., Wu, C., Gu, W., Klein, T., Crawford, R. and Xiao, Y. (2014) Osteogenic Differentiation of Bone Marrow MSCs by β -Tricalcium Phosphate Stimulating Macrophages via BMP2 Signalling Pathway. *Biomaterials*, **35**, 1507-1518. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.014>
- [65] Yin, Y., Li, X., Ma, H., Zhang, J., Yu, D., Zhao, R., *et al.* (2021) *In Situ* Transforming RNA Nanovaccines from Poly-ethylenimine Functionalized Graphene Oxide Hydrogel for Durable Cancer Immunotherapy. *Nano Letters*, **21**, 2224-2231. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c05039>
- [66] Newman, H., Shih, Y.V. and Varghese, S. (2021) Resolution of Inflammation in Bone Regeneration: From Understandings to Therapeutic Applications. *Biomaterials*, **277**, Article 121114. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121114>
- [67] Zhang, J., Shi, H., Zhang, N., Hu, L., Jing, W. and Pan, J. (2020) Interleukin-4-Loaded Hydrogel Scaffold Regulates Macrophages Polarization to Promote Bone Mesenchymal Stem Cells Osteogenic Differentiation via TGF- β 1/Smad Pathway for Repair of Bone Defect. *Cell Proliferation*, **53**, e12907. <https://doi.org/10.1111/cpr.12907>
- [68] Zou, M., Sun, J. and Xiang, Z. (2021) Induction of M2-Type Macrophage Differentiation for Bone Defect Repair via an Interpenetration Network Hydrogel with a Go-Based Controlled Release System. *Advanced Healthcare Materials*, **10**, Article 2001502. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001502>
- [69] Seebach, C., Henrich, D., Schaible, A., Relja, B., Jugold, M., Bönig, H., *et al.* (2015) Cell-Based Therapy by Implanted Human Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells Improved Bone Healing of Large Bone Defects in Rats. *Tissue Engineering Part A*, **21**, 1565-1578. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0410>
- [70] Krieger, J.R., Ogle, M.E., McFaline-Figueroa, J., Segar, C.E., Temenoff, J.S. and Botchwey, E.A. (2016) Spatially Localized Recruitment of Anti-Inflammatory Monocytes by SDF-1 α -Releasing Hydrogels Enhances Microvascular Network Remodeling. *Biomaterials*, **77**, 280-290. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.045>
- [71] Arron, J.R. and Choi, Y. (2000) Bone versus Immune System. *Nature*, **408**, 535-536. <https://doi.org/10.1038/35046196>
- [72] Dimitriou, R., Mataliotakis, G.I., Angoules, A.G., Kanakaris, N.K. and Giannoudis, P.V. (2011) Complications Following Autologous Bone Graft Harvesting from the Iliac Crest and Using the RIA: A Systematic Review. *Injury*, **42**, S3-S15. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.015>
- [73] Dill, T., Schächinger, V., Rolf, A., Möllmann, S., Thiele, H., Tillmanns, H., *et al.* (2009) Intracoronary Administration of Bone Marrow-Derived Progenitor Cells Improves Left Ventricular Function in Patients at Risk for Adverse Remodeling after Acute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: Results of the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction Study (REPAIR-AMI) Cardiac Magnetic Resonance Imaging Substudy. *American Heart Journal*, **157**, 541-547. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2008.11.011>