

文章编号:1004-7220(2009)02-0134-04

· 基础研究 ·

## Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路对小鼠骨痂塑形 和生物力学性能的影响

杜科伟, 汤亭亭, 黄研, 薛文东  
(上海交通大学医学院附属第九人民医院 骨科, 上海 200011)

**摘要:** 目的 评价 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路对骨折愈合后期骨痂塑形及其力学性能的影响。方法 选择以 II 型胶原(Col2a1)为启动子表达 ICAT ( $\beta$ -Catenin 和 TCF 的抑制剂)转基因的 8 周龄 Col2a1-ICAT 转基因小鼠和同窝出生野生型小鼠作为实验动物,右下肢胫骨中段截断造成实验性骨折,克氏针固定。于术后第 5 周进行放射学检查、常规 HE 染色观察以及四点弯曲生物力学测试。结果 X 线片显示,骨折后第 5 周,WT 小鼠已达完全愈合;而 Col2a1-ICAT 转基因小鼠骨折线仍模糊可见,骨折愈合不完全。组织学切片显示,骨折后第 5 周,WT 小鼠骨折处的皮质骨连续性已基本恢复,骨皮质较厚;而 Col2a1-ICAT 转基因小鼠骨折处皮质骨的连续性仍不完整,皮质较薄,周围可见较多编织骨存在。四点弯曲生物力学测试显示,野生型小鼠胫骨最大弯曲载荷明显优于 Col2a1-ICAT 转基因小鼠,差异有统计学意义。结论 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号受抑制可延缓骨痂改建的速度,从而影响骨折后生物力学性能的恢复。

**关键词:** Wnt/ $\beta$ -catenin 信号; 骨痂改建; 四点弯曲实验

中图分类号: R318.01 文献标志码: A

## Effects of Wnt/ $\beta$ -catenin signals on the callus modelling and the biomechanical properties of the fractured tibia in mice

DU Ke-wei, TANG Ting-ting, HUANG Yan, XUE Wen-dong (Department of Orthopaedic Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University Shanghai 200011, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the effects of Wnt/ $\beta$ -catenin signals on the callus modelling and the biomechanical properties of the fractured tibia in mice. **Method** Col2a1-ICAT transgenic mice were used and ICAT transgene could specifically expressed in chondrocytes and served as a competitive inhibitor to block Wnt/ $\beta$ -catenin signals. 8-week-old Col2a1-ICAT mice and WT littermates were used in each group and a transverse osteotomy was performed at the middle of the tibia. Fractured bones were stabilized by inserting the inner pin in the cavity. Roentgenography, histology observation and four point bending test were used to compare the callus modelling and biomechanical properties of fractured tibia between two groups 5 weeks after surgery. **Result** The roentgenograph revealed that the fracture repair were completed in the WT mice while the fracture line was still visible in the Col2a1-ICAT mice. Histology sections showed that there were thicker cortical bone and less woven bone in WT mice than in Col2a1-ICAT transgenic mice. Four-point bending test showed that the maximum breaking load of fractured tibia in WT mice was significantly higher than in Col2a1-ICAT transgenic mice. **Conclusions** The block of Wnt/ $\beta$ -catenin signals could delayed the callus modelling and then the recovery of the biomechanical properties of fractured bone.

收稿日期:2009-03-05

基金项目:上海市骨科内植物重点实验室建设基金(08DZ2230330)

作者简介:杜科伟(1980-),男,研究方向:骨再生与修复研究。

通讯作者:汤亭亭,教授,博士生导师,E-mail:tingtingtang@hotmail.com。

**Key words:** Wnt/ $\beta$ -catenin; Callus modelling; Four-point bending test

现代研究认为,骨折愈合过程是人类胚胎期长骨发育的重现<sup>[1]</sup>,大致可分为早期的骨痂形成和后期的骨痂塑形阶段,而塑形过程对骨折愈合后的结构完整性和力学强度恢复十分重要。已有研究表明,Wnt 信号通路在胚胎期骨骼发育的多个环节中起重要作用。Day 和 Hill 的研究提示<sup>[2,3]</sup>,条件性敲除  $\beta$ -catenin 基因会引起小鼠骨化障碍,导致软骨化发生,在形成骨骼之前死亡。我们前期的实验观察也发现,Wnt 信号通路阻断后会影响早期的骨痂形成,导致软骨痂出现延迟,软骨内骨化受阻。本研究拟进一步探讨 Wnt 信号通路阻断对骨折愈合后期骨痂塑形及其力学强度的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物选择

实验组转基因 Col2a1-ICAT 小鼠由美国 Rochester 大学陈棣教授提供,是以 II 型胶原(Col2a1)为启动子,利用基因打靶技术构建的,能在软骨细胞中特异性表达 ICAT (Inhibitor of  $\beta$ -Catenin and TCF) 基因,并作为竞争性抑制剂阻断  $\beta$ -catenin 信号。作为对照组的野生型小鼠 C57BL/6J 由中科院上海生命科学研究所实验动物中心提供。

### 1.2 动物模型的制作

以 8 周龄实验组和对照组小鼠为实验对象,在右侧胫骨中段制作胫骨骨折模型<sup>[4]</sup>。基本方法是:以 0.5% (100 mg/kg) 异戊巴比妥钠腹腔麻醉成功后,暴露右侧胫骨,胫骨中段横断后,插入髓内针(直径 0.45 mm)固定,闭合伤口,在小鼠苏醒前拍摄 X 线观察骨折对位对线情况,有成角和移位畸形的不作为实验对象。小鼠自由活动和饮食,继续饲养于清洁级动物房。

### 1.3 观察内容及方法

**1.3.1 X 线检查** 于骨折后第 5 周拍摄 X 线片,进行影像学观察分析,观察骨折愈合及骨痂形成情况。

**1.3.2 组织学检查** 骨折后第 5 周处死动物,取骨折区标本常规脱钙石蜡包埋后制作切片,进行 HE 染色,观察骨折愈合情况。

**1.3.3 生物力学测试** 术后 5 周处死动物后取骨

折区标本,同时收集同组对侧未骨折胫骨做为对照,生理盐水纱布包裹置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  深低温冰箱保存。测试前解冻,取出髓内针,修整胫骨远近端。标本制备及测试时保持湿润,放置在 Instron 材料试验机上,以四点弯曲实验<sup>[5,6]</sup>测试最大弯曲载荷(单位: N)。测试时跨距 1 cm,加载速度 1 mm/min。

**1.3.4 统计学分析** 采用 SAS6.12 统计软件包进行分析。所有数据以(均数  $\pm$  标准差)表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用 t 检验,  $P < 0.05$  表示对比组之间的差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 X 线片观察

骨折后第 5 周可见(图 1):WT 小鼠组骨折线模糊不清,骨的连续性完整,已经恢复骨折前的力学结构,骨折断端无明显骨痂可见;而 Col2a1-ICAT 转基因小鼠骨折愈合处于重塑阶段,骨折线仍模糊可见,骨折断端仍可见骨痂组织存在,骨折尚未完全愈合。

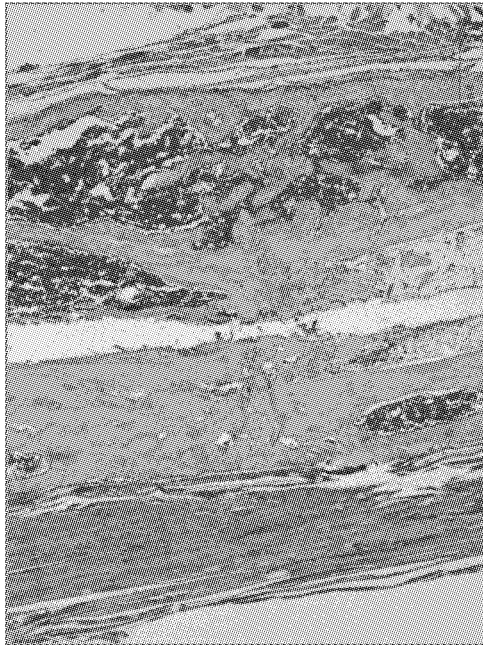


图 1 骨折后第 5 周胫骨的 X 线片(左侧为 WT 小鼠,右侧为 Col2a1-ICAT 转基因小鼠)

Fig.1 The roentgenograph revealed that the fracture repair were completed in the WT mice (left) while the fracture line was still visible in the Col2a1-ICAT mice(right).

## 2.2 组织学观察

组织学观察可见(图2),骨折后第5周,WT小鼠骨折处的皮质骨连续性已基本恢复,骨皮质较厚;



而 Col2al-ICAT 转基因小鼠骨折处皮质骨的连续性仍不完整,皮质较薄,周围可见编织骨存在,骨折仍处于塑形改建阶段。

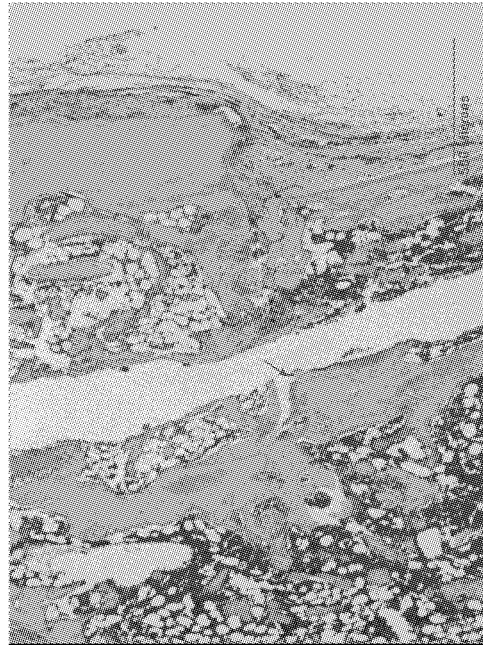


图2 骨折后第5周的组织学切片显示观察骨折愈合情况,左侧为 WT 小鼠,骨折处的皮质骨已连续,骨皮质较厚;右侧为 Col2al-ICAT 转基因小鼠,骨折处的皮质骨仍不连续,皮质较薄。红色箭头显示原骨折线位置。(HE 染色,5X)

Fig.2 Histology sections showed that there were thicker cortical bone and less woven bone in WT mice (left) than in Col2al-ICAT transgenic mice(right) (HE staining, 5X)

## 2.3 生物力学测试

四点弯曲测试结果(图3)显示:骨折后第5周,Col2al-ICAT 转基因小鼠组骨折区最大弯曲载荷低于 WT 小鼠骨折组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),正常未骨折组两者相比无明显差异( $P > 0.05$ );WT

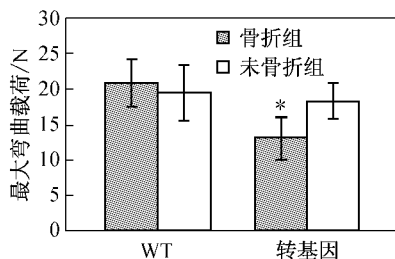


图3 骨折后第5周各组的最大弯曲载荷( $n=7$ )。\*示与 WT 骨折组、WT 未骨折组以及转基因未骨折组比较,均为  $P < 0.05$ 。

Fig.3 Comparison of maximum bending load (Mean  $\pm$  s,  $n=7$ ) in each group at four-point bending test showed that the maximum breaking load of fractured tibia in WT mice was significantly higher than in Col2al-ICAT transgenic mice 5 weeks post surgery ( $P < 0.05$ ).

小鼠组最大弯曲载荷略高于正常未骨折组,但差异无统计学意义。

## 3 讨论

Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在进化上十分保守,参与多种发育过程<sup>[7]</sup>。目前认为, $\beta$ -catenin 是 Wnt 信号通路的枢纽分子,介导 Wnt 信号从膜至胞浆进核的传递, $\beta$ -catenin 转位入细胞核后,与转录因子 TCF 形成转录复合物,促进下游靶基因的增殖和分化<sup>[8]</sup>。小鼠的间充质细胞和软骨细胞如丧失  $\beta$ -catenin 功能,出生后即会死亡,因此无法构建  $\beta$ -catenin 基因敲除的动物模型。

本研究采用的 Col2al-ICAT 转基因小鼠是一种条件性基因敲除的模型<sup>[9]</sup>,即以 II 型胶原(Col2al)为启动子表达 ICAT 转基因,特异性作用于软骨细胞。ICAT(Inhibitor of  $\beta$ -Catenin and TCF)可以抑制  $\beta$ -catenin 结合到 TCF,扰乱  $\beta$ -catenin/TCF/DNA 的形成,从而抑制下游目标基因的转录<sup>[10]</sup>。这样既保

证了 Col2al-ICAT 转基因小鼠出生后可以存活,又保证了在骨折愈合过程中软骨细胞开始表达 II 型胶原基因时才阻断  $\beta$ -catenin 信号分子,可以研究 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路对骨折愈合过程的影响。

骨折愈合是一个复杂的再生修复过程,通常分为 I 期愈合和 II 期愈合。II 期愈合是在膜内成骨和软骨内成骨的基础上达到的愈合。在大多数临床情况下,骨折断端存在一定的间隙和微动,II 期愈合是主要的骨折愈合形式,这时软骨内成骨过程的好坏直接影响骨折愈合的质量,从而对骨折愈合强度产生重要影响。

我们先前的研究发现,Wnt 信号通路阻断后会影响早期的骨痂形成,导致软骨痂出现延迟,软骨内骨化受阻。Silkstone, Chen 等研究也发现<sup>[11-12]</sup>,在 TCF 报道基因为启动子的转基因小鼠模型中, $\beta$ -catenin 在骨折愈合的整个过程均有表达,而且 Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt10b, Wnt11, Wnt13 均在骨折愈合过程中升高,这提示 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号系统在骨折愈合过程中被激活,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号在骨折愈合中起重要作用;他们的研究还发现,抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号会引起骨折愈合延迟。在本研究中,X 线片和组织学观察显示,骨折后第 5 周,WT 小鼠组骨折已完全愈合,Col2al-ICAT 转基因小鼠骨痂仍处于重塑阶段,骨折线仍模糊可见,骨折愈合明显延迟,这说明 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路会进一步影响骨折愈合的骨痂改建过程。

骨折愈合的最终目标是形成完整的连接和恢复原有的生物力学性能,以适应负重和活动的要求。四点弯曲试验结果显示:骨折后第 5 周,Col2al-ICAT 转基因小鼠组的最大弯曲载荷明显弱于 WT 小鼠组,差异有统计学意义,未骨折组两者相比无明显差异。这说明骨痂改建的延迟妨碍了其生物力学性能的恢复。另一方面, $\beta$ -catenin 信号通路激活可能有利于骨折愈合。有报告发现,氯化锂可以通过抑制 GSK3 $\beta$  的活性而激活  $\beta$ -catenin 信号通路<sup>[13]</sup>,而且氯化锂可以促进骨的形成和增加骨量。Chen 等<sup>[12]</sup>研究发现,在小鼠骨折后给予氯化锂治疗,可以观测到骨折部位  $\beta$ -catenin 水平的明显增高,组织学发现大量未分化细胞聚集骨折断端,骨量明显增加。

综上所述,通过对 Col2al-ICAT 转基因小鼠实验性骨折愈合后期的观察发现,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号受

抑制可延缓骨痂改建的速度,从而影响骨折后生物力学性能的恢复,因此通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号可以影响骨折愈合的进程。

**致谢** 感谢美国 Rochester 大学陈棣教授提供的转基因动物及对本论文写作的指导。

#### 参考文献:

- [1] Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Developmental aspects of fracture healing and the use of pharmacological agents to alter healing[J]. J Musculoskelet Neuronal Interact,2003, 4:297-303.
- [2] Day T, Guo X, Garrett-Beal, et al. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis[J]. Dev Cell,2005,8:739-750.
- [3] Hill T R, Spater D, Taketo M, et al. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes[J]. Dev Cell,2005,8:727-738.
- [4] Le AX, Miclau T, Hu D, et al. Molecular aspects of healing in stabilized and nonstabilized fractures [J]. J Orthop Res, 2001,19:78-84.
- [5] Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial[J]. Bone,1993,14:595-608.
- [6] Lieberman DE, Polk JD, Demes B. Predicting long bone loading from cross-sectional geometry[J]. Am J Physical Anthropol,2004,123:156-171.
- [7] Taipale J, Beachy PA. The hedgehog and wnt signalling pathways in cancer[J]. Nature,2001, 411(6835):349-354.
- [8] Gavert N, Ben-Ze'ev A. Beta-Catenin signaling in biological control and cancer[J]. J Cell Biochem,2007,102(4): 820-8.
- [9] Zhu M, Chen M, Zuscik M, et al. Inhibition of  $\beta$ -catenin signaling in articular chondrocytes results in articular cartilage destruction[J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(7):2053-2064.
- [10] Tago K, Nakamura T, Nishita M, et al. Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel-catenin-interacting protein[J]. Genes Dev,2000,14(14):1741-9.
- [11] Silkstone D, Hong H, Alman BA. Beta-catenin in the race to fracture repair: In it to Wnt[J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008,4(8):413-9.
- [12] Chen Y, Whetstone HC, Lin AC, et al. Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: Implications for therapy to improve bone healing [J]. PLoS Med,2007,4(7):e249.
- [13] Phiel CJ, Klein PS. Molecular targets of lithium action[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001,41:789-813.