

GIT1 蛋白通过调节血管形成促进骨折愈合

余金杰^{1,2}, 张宁^{1*}, 凡进¹, 万博文¹, 蔡卫华¹, 殷国勇¹

(¹南京医科大学第一附属医院骨科, 江苏 南京 210029; ²南京市同仁医院骨科, 江苏 南京 211102)

[摘要] 目的:探讨 G 蛋白偶联受体激酶结合蛋白 1(GIT1)在骨折愈合过程中的作用。方法:应用 GIT1 基因敲除小鼠和同窝野生型小鼠制作股骨骨折模型,每组 30 只。造模成功后 7、14、21 d,应用 X 线、micro-CT、PECAM1 免疫荧光染色等方法分析骨痂体积及新生血管情况。结果:与野生型小鼠相比,GIT1 基因敲除小鼠骨折愈合延迟,骨痂内新生血管的体积和数量减少。结论:GIT1 基因缺失导致骨痂区新生血管减少,从而延迟骨折愈合。

[关键词] G 蛋白偶联受体激酶结合蛋白 1;骨痂;新生血管

[中图分类号] R274.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)10-1324-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20141007

GIT1 promotes bone healing by regulating vascularization

Yu Jinjie^{1,2}, Zhang Ning^{1*}, Fan Jin¹, Wan Bowen¹, Cai Weihua¹, Yin Guoyong¹

(¹Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Orthopedics, Nanjing Tongren Hospital, Nanjing 211102, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of G protein coupled receptor kinase 2 (GRK2) interacting protein-1 (GIT1) in bone fracture healing. **Methods:** Femur fractures in GIT1 knockout (GIT1KO) mice ($n=30$) and WT mice ($n=30$) were performed. X-ray, micro-computed tomography imaging (micro-CT), immunofluorescence of PECAM1 were performed 7, 14 and 21 days after fracture. **Results:** Fracture healing was delayed and blood vessel volume as well as number were decreased in GIT1KO mice compared to those in WT controls. **Conclusion:** GIT1 is an important signaling participant in fracture healing, with gene ablation leading to reduced callus vascularity and reduced osteoclast number in the healing callus.

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(10): 1324-1328]

骨折愈合是一个复杂的过程,包括血肿机化期、原始骨痂形成期、骨痂改造塑形期。在早期炎症反应阶段,由于血管缺乏造成局部缺血,形成软骨骨痂,从而启动以软骨内成骨为主的分化过程。此过程中,血管形成并侵入软骨骨痂促进骨折愈合^[1-2]。血管生成的药物抑制剂可通过减少骨痂矿化而抑制骨折愈合,且血管形成缺陷往往导致骨质疏松及佝偻病。G 蛋白偶联受体激酶结合蛋白(GIT)家族包括 GIT1 和 GIT2 两种蛋白,属于多结构域分子蛋白。我们既往研究表明:GIT1 在骨折愈合中起重要调节作用,其表达的缺失往往导致骨折愈合延迟^[3],但具体机制尚未被明确阐明。本研究拟利用 GIT1 基因敲

除小鼠制作股骨骨折模型,研究骨折愈合过程中 GIT1 对骨痂内新生血管的影响,探讨 GIT1 调节骨折愈合的具体机制。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物自美国 Rochester 大学 AAB 心血管研究所引进,共分为两组:实验组及空白组,每组 30 只。其中,实验组选用 10~12 周 GIT1 基因敲除小鼠(GIT1KO,来源于杂交超过 7 代的 C57/BL6 小鼠),对照组为同窝野生型小鼠。荧光标记 PECAM1 抗体购自美国 AbCam 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠股骨骨折模型

腹腔注射氯胺酮和赛拉嗪麻醉后,切开小鼠左

[基金项目] 国家自然科学基金(81271988)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhangning2003@medmail.com

膝皮肤及皮下组织,通过髌腱将 25 号针头插入股骨髓腔,Einhorn 设备通过三点弯曲法实现股骨中段骨折;造模成功后连续 3 d 皮下给与丁丙诺啡(0.5 mg/kg)止痛。造模成功后 7、14、21 d 处死实验动物,进行相关实验。

1.2.2 Micro-CT 影像

肝素生理盐水冲洗血管后,灌注铬酸盐造影剂,联合 micro-CT 分析骨痂。10%EDTA 溶液脱钙 21 d,再次扫描,得到骨痂内仅有血管的图像。通过脱钙前后的二维切片分析,确定骨痂内部及其周边血管结构,利用信号强度数值,整合扫描图像,形成新生骨痂中三维血管图像,计算血管体积、数量、间距及连接密度。

1.2.3 免疫荧光化学染色

取股骨骨折切片,进行二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,柠檬酸缓冲液、PBS 洗涤后封闭 30~60 min,加入 PECAM1 抗体 4℃ 孵育过夜;两次 PBS 漂洗后加入二抗室温下孵育 1 h 后,共聚焦显微镜下观察。

1.3 统计学方法

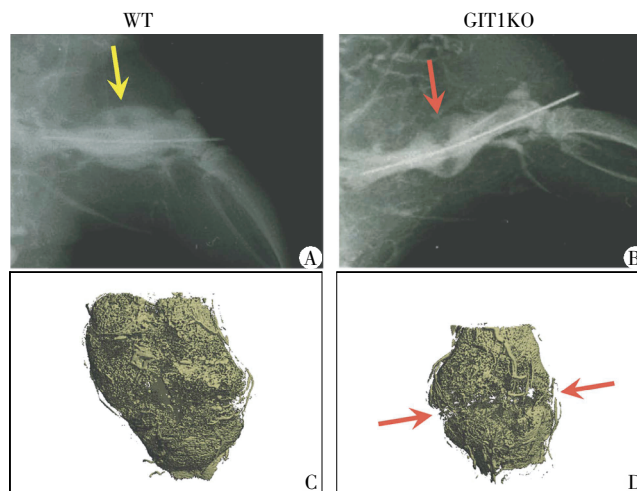
所有数值以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异用 ANOVA (大于 3 组比较)或双侧不对称 *t* 检验(两组比较)。 $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GIT1 基因敲除小鼠骨折愈合延迟

为明确 GIT1 基因对骨折愈合的影响,我们通过 X 线对骨折愈合进行评估,通过 micro-CT 分析骨痂体积。X 线结果表明:骨折后 14 d,野生型小鼠骨折部位 X 线透过性降低,GIT1 基因敲除小鼠骨折线仍清晰可见。特异性 micro-CT 重建结果表明:野生型小鼠骨痂矿化物连续,GIT1 基因敲除小鼠骨折端矿化物持续分离(图 1)。上述结果表明,野生型小鼠骨折愈合正常,而 GIT1 基因敲除小鼠骨折愈合延迟。

2.2 GIT1 基因敲除小鼠骨痂内血管体积和数量减少



骨折后 14 d,X 线图片显示野生型小鼠(A,黄箭头)和 GIT1 基因敲除小鼠(B,红箭头)骨痂 X 线透过性;micro-CT 分析野生型小鼠(C)及 GIT1 基因敲除小鼠(D,红箭头)骨痂矿化物量(n=4)。

图 1 GIT1KO 小鼠骨折愈合延迟
Figure 1 Delayed union in GIT1KO mice

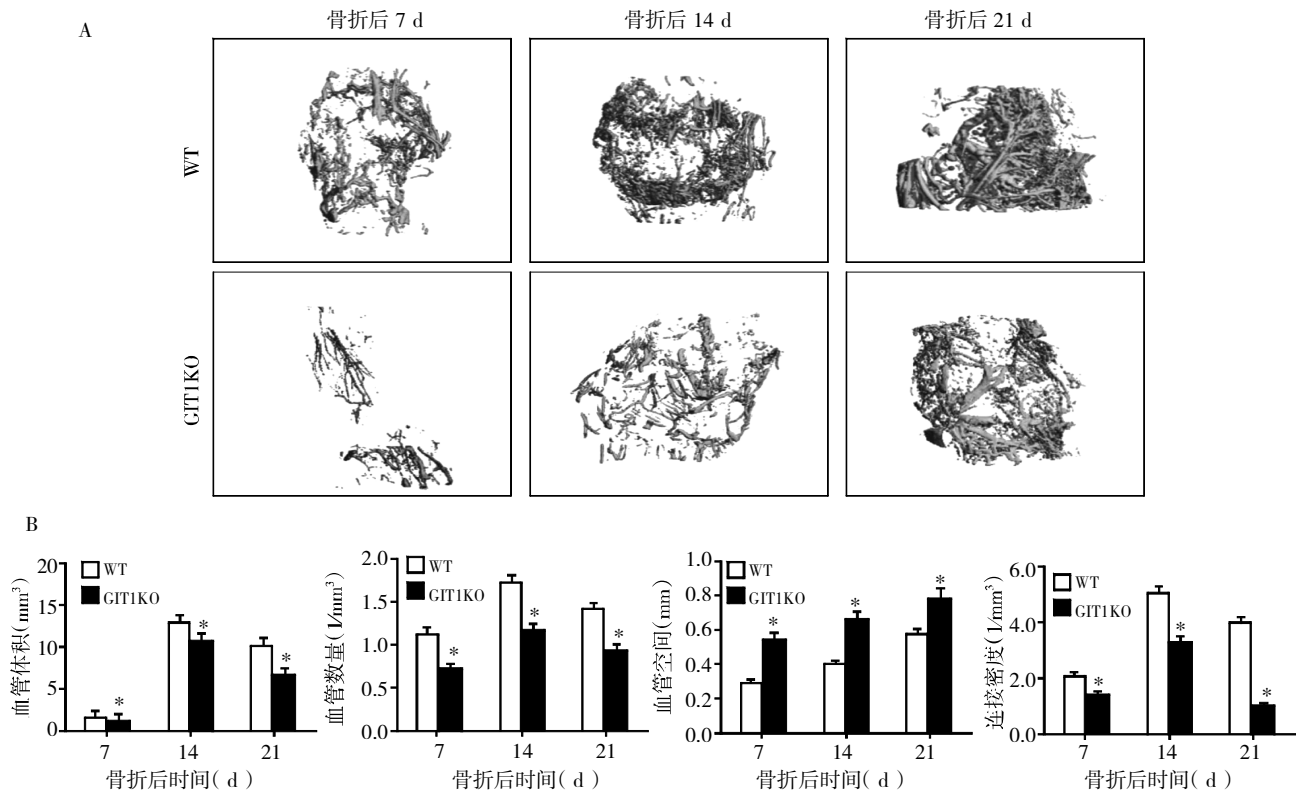
为探讨 GIT1 对骨痂内新生血管的调节作用,我们利用定量血管 micro-CT 分析评估野生型小鼠和 GIT1 基因敲除小鼠骨折 7、14、21 d 后新生血管情况,结果表明,GIT1 基因敲除小鼠骨痂内新生血管少于野生型小鼠,并且血管体积、数量以及连贯性显著降低(图 2A)。血管相关参数定量分析结果亦表明,与野生型小鼠相比,GIT1 基因敲除小鼠血管体积和数量更少,且血管间的空间更多、血管连接密度更低(图 2B)。

为了进一步评估血管生成,我们使用抗 PECAM1(CD31)抗体分析血管数量,结果表明,与野

生型小鼠相比,GIT1 基因敲除小鼠骨痂区 PECAM1 阳性血管数量低于野生型小鼠(图 3A~D)。骨折后 7、14 d,野生型小鼠骨痂的 PECAM1 阳性血管数目是 GIT1 基因敲除小鼠的 2~3 倍(图 3E)。

3 讨论

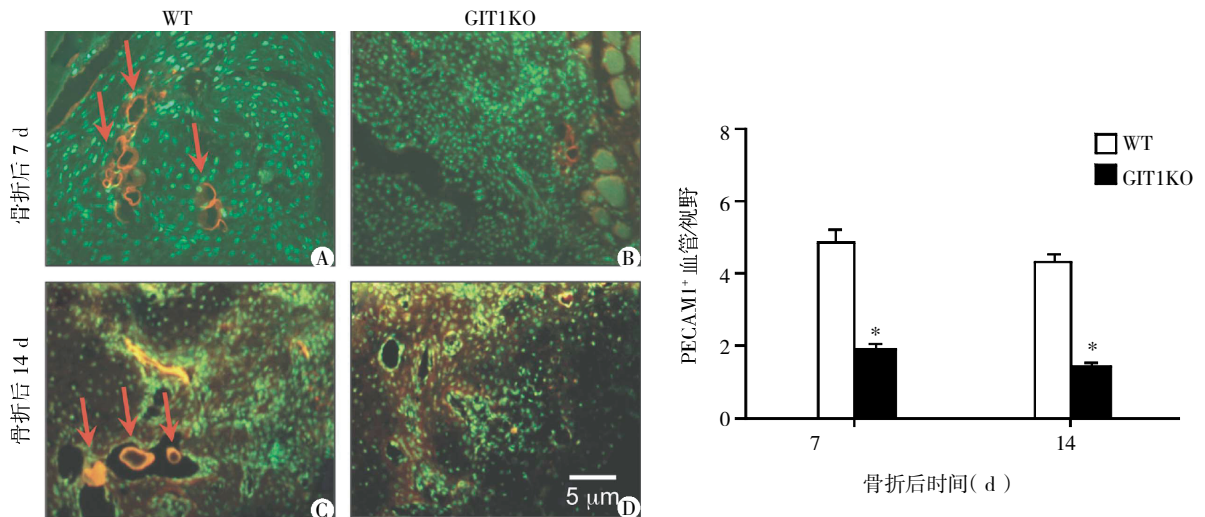
骨折愈合是一个复杂的过程,它涉及骨髓间充质干细胞的增殖与分化,炎性因子的表达与趋化以及新生血管形成等^[1-2]。在机体发生骨折后,修复过程包括:骨折端血肿形成期、炎症反应期、软骨性骨痂期和骨痂塑形期。骨折不能如期愈合是骨折患者



与野生型(WT组)比较,*P < 0.05(n=3)。

图 2 GIT1KO 小鼠骨痂血管减少

Figure 2 Reduction of callus blood vessels in GIT1KO mice



骨折后 7、14 d,进行特异性 PECAM1 免疫荧光染色(A~D)(图中箭头所指为 PECAM1 免疫荧光标记的阳性血管)。直方图表示每个视野 PECAM1 阳性细胞数量(n=3,*P < 0.01)。

图 3 GIT1KO 小鼠 PECAM1 阳性血管数量减少

Figure 3 Decrease of the number of the PECAM1 positive blood vessels in GIT1KO mice

的严重并发症,约占骨折的 10%~15%。骨折不愈合会导致患者肌肉萎缩、关节僵硬、功能残疾甚至死亡,严重威胁人类健康。骨折愈合机制至今尚未被明确阐明,其临床治疗亦是难题。目前的研究普遍认为:

骨折端的新生血管形成是骨折如期愈合的关键,任何影响新生血管形成的因素都将影响骨折愈合^[4],但目前为止尚缺乏对骨折端新生血管形成的机制研究。

作为胞内局部黏附蛋白,GIT1 是最初被证实与

GRK2 相互结合参与肾上腺素能受体内吞过程的蛋白质。我们既往研究证实:作为 MEK1/ERK1/2 通路的特异性穿梭蛋白,GIT1 蛋白对骨折愈合有重要作用。GIT1 蛋白包括氨基末端锌指样结构和激活 GTPase 的蛋白结构区域 (GAP)、Ankyrin 重复区域(ANK)、SHD(Spa2 homology domain)区域、3 个盘绕结构(coiled-coil structure,CC)区域和羧基末端的 Paxillin 结合区域(PBS)^[5]。研究表明,具有 ANK 重复区域的蛋白质具有在胞浆内和转录相关的蛋白结合并转移至细胞核内增加其转录活性的能力,如 Notch 的 ANK 重复区域通过自身的丝氨酸磷酸化使 CSL 从胞浆转移至胞核内增加其转录活性,促进靶基因的转录与表达^[6];同时 ANK 重复区域通过自身形成的二聚体且丝氨酸磷酸化促进了 Myc 的细胞核内含量和转录活性^[7];ANK 重复区域的二聚体和丝氨酸磷酸化增强和转录因子 RBPJ 的结合能力,提高其核内含量及 DNA 结合的能力^[8]。GIT1 具有 ANK 重复区域,并且通过 ANK 的重复区域形成二聚体,具有细胞核内功能^[9];另有研究发现 GIT1 的 ANK 重复区域具有确定的丝氨酸磷酸化位点。我们前期研究发现:GIT1 在肺血管发展中起着关键作用,GIT1 基因敲除小鼠的肺血管存在缺陷。随后,我们对 GIT1 蛋白调节骨折愈合过程中新生血管的作用进行了研究,结果发现:降低 GIT1 蛋白表达和 GIT1 某些重要氨基酸突变(Y321F、Y392F)都引起骨折区域新生血管形成的显著减少,导致骨折不愈合^[11-12],但是 GIT1 蛋白调节骨折端新生血管形成的机制尚不清楚。本研究通过 X 线及 micro-CT 重建方法证明:与野生型小鼠相比,GIT1 基因敲除小鼠骨折愈合延迟;骨痂内新生血管 micro-CT 重建结果及血管相关参数评估结果表明:与野生型小鼠相比,GIT1 基因敲除小鼠新生血管体积、数量、连接密度均减少,血管间的空间增大。上述结果提示:GIT1 基因敲除小鼠骨折愈合的延迟可能和骨痂中的新生血管形成受限相关。同时,由于骨折区骨痂矿化体积除受血管形成和成骨细胞矿化能力等因素的影响外,还受破骨细胞数量和功能的影响。既往研究显示,GIT1 基因敲除小鼠破骨细胞功能降低^[13]。这可能导致编织骨的二次重塑减弱,使骨痂处于原始编织骨状态,正常的板层骨生成障碍;而原始编织骨也处于矿化状态,因此野生型小鼠和 GIT1 基因敲除小鼠矿化体积并无明显区别,而骨折愈合则延迟。

既往研究表明:骨折愈合过程中,骨痂内新生血管的形成受到血管内皮生长因子(vascular endothe-

lial growth factor,VEGF)以及同源受体 VEGFR1 和 VEGFR2 的调控^[14-15]。作为调节内皮细胞及成骨细胞中 PLC- γ 和 ERK1/2 活性的重要蛋白,GIT1 亦可调节成骨细胞中 VEGF 的表达^[16]。因此,我们推测:GIT1 基因表达缺失可能导致骨痂中 VEGF 及其受体表达水平降低。在后续研究中,我们将继续对 GIT1 调节骨痂内 VEGF 的作用机制进行研究,进一步明确 GIT1 调节骨折愈合的具体机制。

[参考文献]

- [1] Dimitriou R,Tsiridis E,Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing[J]. *Injury*,2005,36(12):1392-1404
- [2] 胥少汀. 实用骨科学[M]. 3 版,北京:人民军医出版社,2005
- [3] Rui Z,Li X,Yin G,et al. GIT1Y321 phosphorylation is required for ERK1/2 and PDGF dependent VEGF secretion from osteoblasts to promote angiogenesis and bone healing[J]. *Int J Mol Med*,2012,30(40):819-825
- [4] Segar CE,Ogle ME,Botchwey EA. Regulation of angiogenesis and bone regeneration with natural and synthetic small molecules[J]. *Curr Pharm Des*,2013,19(19):3003-3019
- [5] Zhang N,Cai W,Yin G,et al. GIT1 is a novel MEK1-ERK1/2 scaffold that localizes to focal adhesions[J]. *Cell Biol Int*,2010,34(1):41-47
- [6] Nudelman F,Pieterse K,George A,et al. The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitor[J]. *Nat Mater*,2010,9(12):1004-1009
- [7] Huang YC,Lin YM,Chang TW,et al. The flexible and clustered lysine residues of human ribonuclease 7 are critical for membrane permeability and antimicrobial activity[J]. *J Biol Chem*,2007,282(7):4626-4633
- [8] Pinheiro A,Woolf JM,Abi-Rached L,et al. Computational analyses of an evolutionary arms race between mammalian immunity mediated by immunoglobulin A and its subversion by bacterial pathogens[J]. *PLoS One*,2013,8(9):e73894
- [9] Giolkowski M,Rozanek M,Bryszewska M,et al. The influence of PAMAM dendrimers syefac groups on their interaction with porcine pepsin[J]. *Biochim Biophys Acta*,2013,1834(10):1982-1987
- [10] Ren Y,Yu L,Yin G,et al. Phosphorylation of GIT1 tyrosine 321 is required for association with FAK at focal adhesion and for PDGF-activated migration of osteoblast[J]. *Mol Cell Bio*,2012,365(1-2):109-118
- [11] Yin G,Sheu TJ,Menon P,et al. Berk:Impaired angiogen-

- esis during fracture healing in GPCR kinase 2 interacting protein-1 (GIT1) knock out mice[J]. PLoS One, 2014, [Epub ahead of print]
- [12] Wang J, Yin G, Menon P, et al. Phosphorylation of GIT1 tyrosine 392 is required for PLC-gamma activation and podosome formation in vascular smooth muscle cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(10):1976-1982
- [13] Menon P, Yin G, Smolock EM, et al. GPCR kinase 2 interacting protein 1 (GIT1) regulates osteoclast function and bone mass [J]. J Cell Physiol, 2010, 225 (3):777-785
- [14] Eckardt H, Bundgaard KG, Christensen KS, et al. Effects of locally applied vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF inhibitor to the rabbit tibia during distraction osteogenesis [J]. J Orthop Res, 2003, 21(2):335-340
- [15] Athanasopoulos AN, Schneider D, Keiper T, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced up-regulation of CCN1 in osteoblasts mediates proangiogenic activities in endothelial cells and promotes fracture healing [J]. J Biol Chem, 2007, 282(37):26746-26753
- [16] Wang J, Taba Y, Pang J, et al. GIT1 mediates VEGF induced podosome formation in endothelial cells: critical role for PLCgamma[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(2):202-208

[收稿日期] 2014-06-13

参考文献的著录格式

1. 期刊

[顺序号] 作者. 题名[J]. 刊名, 年份, 卷号(期号): 起止页码

示例:

[1] 徐春阳, 杨 荣, 张 浩, 等. NOMO1 基因在大鼠胚胎心脏发育过程中的表达[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2013, 32(6): 728-731

[2] Li JZ, Bunney BG, Meng F, et al. Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(24):9950-9955

2. 专著

[顺序号] 作者. 书名[M]. 版本. 出版地: 出版者, 年份: 起止页码

示例:

[3] 何 维. 医学免疫学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 136

3. 析出文献

[顺序号] 析出文献责任者. 析出文献题名[M]//. 析出文献其他责任者或专著主要责任者. 专著题名: 其他题名信息. 出版地: 出版者, 年份: 析出文献起止页码

示例:

[4] 林穗芳. 美国出版业概况[M]//陆本瑞. 世界出版概况. 北京: 中国书籍出版社, 1991: 1-23

[5] 钟文发. 非线性规划在可燃毒物配置中的应用 [C]//赵 玮. 运筹学的理论与应用: 中国运筹学会第五届大会论文集. 西安: 西安电子科技大学出版社, 1996: 468-471

(本刊编辑: 接雅俐)