

GIT1 通过 BMP-2/p-Smad1/5/8 信号通路调节骨折愈合

徐巧明^{1,2}, 凡进¹, 周炜¹, 蔡卫华¹, 张宁^{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昆山市第六人民医院骨科, 江苏 昆山 215300)

[摘要] 目的:探讨 G 蛋白偶联受体激酶结合蛋白 1(G-protein coupled receptor kinase-interacting protein 1, GIT1)影响骨折愈合的具体机制。方法:分别取 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 2 周,免疫组化检测骨痂区软骨细胞矿化及 p-Smad1/5/8 表达量。分别取 2 组小鼠的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs),予以 10 ng/mL 的骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)刺激后检测 Smad1/5/8 磷酸化水平和核转入能力;取 C3H10T1/2 细胞,分别用 1 μ g pGL3 重组质粒和 1 μ g GIT1-siRNA 共转染细胞,荧光报告素酶技术检测细胞内 GIT1 蛋白对 BMP2 转录水平的影响。结果:与同窝野生型小鼠相比, GIT1 基因敲除小鼠软骨内骨化减弱,骨痂区软骨细胞堆积,骨折愈合延迟, p-Samd1/5/8 表达水平明显减少;与 GIT1 基因敲除小鼠相比, BMP2 可明显提高同窝野生型小鼠 BMCs 中 p-Samd1/5/8 核转入能力; GIT1 蛋白表达的缺失可明显降低 BMP2 的转录水平。结论: GIT1 可通过调节 Samd1/5/8 的磷酸化及 BMP2 信号转导影响骨折部位的软骨内骨化。

[关键词] G 蛋白偶联受体激酶结合蛋白 1; 骨形态发生蛋白 2; 骨折愈合; 软骨内骨化

[中图分类号] Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)10-1355-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20151004

The mechanism of fracture healing regulated by GIT1 though BMP-2 p-Smad1/5/8 signal pathway

Xu Qiaoming^{1,2}, Fan jin¹, Zhou Wei¹, Cai Weihua¹, Zhang Ning^{1*}, Yin Guoyong¹

(¹Department of Orthopedics, the Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Orthopedics, the Sixth Hospital of Kunshan, Kunshan 215300, China)

[Abstract] **Objective:** To study the role of G-protein coupled receptor kinase-interacting protein 1 (GIT1) in fracture healing. **Methods:** GIT1 knockout (KO) mice ($n=30$) and GIT1 wildtype (WT) mice ($n=30$) were used to established the femoral model according to our pervious study. Immunohistochemical (IHC) staining was used to detect the endochondral mineralization and the expression of Smad1/5/8 in callus area. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) of GIT1 WT and KO mice were collected and stimulated with 10 ng/mL BMP2, and then the expression of p-Smad1/5/8 and the level of p-Smad1/5/8 translocated into the nuclei of BMSCs were detected. One μ g of GIT1-siRNA (or control-siRNA) was co-transfected into C3H10T1/2 cells. Luciferase reporter genes was used to detecte the influence of GIT1 on BMP2 transcription. **Results:** GIT1 KO mice exhibited delayed fracture healing, chondrocyte accumulation in the fracture area, and reduced staining intensity of phosphorylated Smad1/5/8 (p-Smad1/5/8). BMSCs extracted from GIT1 KO mice showed a decline of p-Smad1/5/8 levels and of p-Smad1/5/8 translocated into the cell nucleus after BMP2 stimulus. The results of luciferase reporter gene assay showed that the level of intracellular GIT1 protein significantly affected the level of BMP2 transcription through p-Smad1/5/8. **Conclusion:** GIT1 regulates Smad1/5/8 phosphorylation and mediates BMP2 regulation, thus affecting endochondral ossification.

[Key words] G-protein coupled reaptor kinase-interacting protein 1; bone morphogenetic protein 2; fracture healing; endochondral ossification

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(10): 1355-1359]

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81271988)

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

骨折愈合是一个复杂过程,涉及骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)分化和生长、炎性因子表达、软骨细胞分化和成熟等^[1-2]。骨折愈合初期,骨折部位血管的缺乏导致局部缺氧,进而导致一系列炎性因子的释放,并诱导 BMSCs 分化成软骨细胞和成骨细胞。随后,骨折部位的软骨细胞合成细胞外基质形成软骨痂。软骨痂形成后骨折部位初步稳定,随着新生血管长入软骨痂,血管内成骨组织取代无血管软骨痂,形成真正的骨组织。软骨痂的形成对于骨组织发生非常重要,但过多堆积的软骨痂将妨碍成骨组织的形成,导致骨折不愈合。

软骨痂的形成和分化过程受多种细胞因子调节,其中骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)的作用尤其重要。BMPs 有 20 余种亚型,其中 BMP2 活性最强,可直接诱导 Smad1/5/8 磷酸化并转入核内,进而促进骨折愈合^[3-4]。G 蛋白偶联受体激酶结合蛋白 1(G-protein coupled receptor kinase-interacting protein 1, GIT1) 是细胞内特异性穿梭蛋白,可与多种蛋白激酶相互作用从而调节细胞整体功能^[5-6]。本课题组前期的研究已经表明, GIT1 在调节破骨细胞的功能中起重要作用^[7]。最新研究发现, GIT1 在骨折愈合过程中至关重要, GIT1 表达的缺失可致骨折愈合延迟^[8]。但是, GIT1 调节骨折愈合的具体机制尚未被明确阐明。

本研究拟采用 GIT1 基因敲除(GIT1-KO)小鼠建立股骨骨折模型并分离培养其 BMSCs, 探讨 GIT1 及 BMP2 蛋白在骨折愈合中的作用机制, 初步阐明骨折愈合的分子机制, 为临床骨折不愈合治疗奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

12 周龄 GIT1-KO 小鼠(C57BL/6)及同窝野生型(GIT1-WT)小鼠各 30 只,雌雄不限,体重 50~75 g,由美国罗切斯特大学心血管病研究所和医学系 Berk 教授构建^[9]并赠送。

RIPA 裂解缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司); II 型胶原抗体(Abcom 公司,美国);兔抗小鼠总 Smad 1/5/8 抗体、p-Smad 1/5/8 抗体、羊抗小鼠 p-Smad1/5/8 抗体、HRP 偶联的二抗(Santa Cruz 公司,美国);Triton X-100、苏木素(Sigma 公司,美国);牛血清白蛋白(Roche 公司,瑞士);蛋白酶 K(Merck 公司,德国);转化生长因子 β (TGF- β)、BMP2(Pepro-

tech 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 股骨骨折动物模型制备

根据既往方法^[10]建立实验动物股骨骨折模型。取 GIT1-KO 小鼠和 GIT1-WT 小鼠各 30 只,腹腔注射 1%戊巴比妥钠(1 mL/kg)麻醉,消毒膝关节周围皮肤组织,25 G 注射针通过髌腱插入至股骨髓腔内,三点弯曲法制备股骨骨折模型,并摄片证实。术后 3 d 内实验动物常规皮下注射丁丙诺啡 0.5 mg/(kg·d)。

1.2.2 动物模型检测指标

造模后 2 周,采用免疫组织化学方法检测 II 型胶原表达量。取骨痂标本 10%福尔马林固定 12~24 h, 5%乙二胺四乙酸脱钙 4~5 周,梯度乙醇脱水,二甲苯渗透,石蜡包埋,5 μ m 连续切片。石蜡切片常规烤片、脱蜡、水化、热修复后,5% H_2O_2 处理 20 min, 5%正常羊血清封闭 1 h, 羊抗小鼠 p-Smad1/5/8 一抗孵育过夜,加兔抗羊 IgG 二抗 37 $^{\circ}$ C 下处理 1 h。光镜下观察切片,随机选择 4 个视野拍摄。在相同光照强度下测算阳性表达率和目标灰度值。

1.2.3 BMSCs 分离培养

GIT1-KO 及 GIT1-WT 小鼠处死后置于 75%乙醇浸泡 3~5 min,取股骨和胫骨,无血清 L-DMEM 培养液反复轻柔冲洗骨髓腔,获取单细胞悬液。离心半径 9.8 cm, 1 200 r/min 离心 5 min,重悬细胞,接种于培养瓶中,37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 培育箱培养^[11]。培养 72 h 后完全培养基半量换液。当细胞融合达 80%并形成较大集落时,2.5 g/L 胰蛋白酶消化细胞,离心后再悬浮,1:2 传代接种于新鲜培养基中。无血清 DMEM 培养基饥饿处理细胞 6 h 后,10 ng/mL BMP2 刺激前以及刺激后 5 min 进行目标蛋白的检测。以 TGF- β 为对照,刺激浓度为 5 ng/mL,时间为 0 和 5 min,刺激方式同 BMP2。

1.2.4 BMSCs 检测指标

Western blot 检测 p-Smad1/5/8 表达:取 BMP2 刺激前后 BMSCs,IPA 裂解缓冲液从细胞中提取蛋白后,采用 Bradford 法进行蛋白定量。SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜,兔抗小鼠 p-Smad1/5/8 一抗孵育过夜,HRP 偶联二抗 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 h,Quantity One 曝光并分析。

细胞免疫荧光分析:取 BMP2 刺激前后 BMSCs,当细胞达 40%~50%融合时 0.2%PBST 清洗,4%多聚甲醛固定 20 min,0.1%Triton X-100 冰上孵育 2 min, PBST 稀释的兔血清室温下孵育 1 h,滴加羊抗鼠 p-Smad1/5/8 抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜,0.2%PBST 洗涤

3 次,加入兔抗羊荧光二抗室温避光孵育 1 h。荧光显微镜下观察细胞免疫荧光密度。

1.2.5 荧光素酶报告基因分析

取 C3H10T1/2 细胞(南京医科大学骨与干细胞研究中心赠送)以 5×10^6 个/mL 密度接种至 6 孔板。当细胞达 80% 融合时,采用 Lipofectamine™ 2000,以 1 μ g pGL3 重组质粒(实验组)和 1 μ g GIT1-siRNA(美国罗切斯特大学心血管病研究所和医学系 Berk 教授构建并馈赠,对照组)共转染细胞。转染后 24 h,收集细胞并采用荧光素酶分析系统检测靶基因 BMP2 的转录活性。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验或单因素方差分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色检测 II 型胶原和 p-Smad1/5/8 表达量

骨折后 2 周,II 型胶原的免疫组织化学染色结果显示:GIT1-WT 小鼠发生明显软骨内骨化,软骨扩张区被划分为多个子区域,软骨区域减少;GIT1-KO 小鼠软骨内骨化不明显,仅发生片状软骨扩张区域,骨折部位的软骨细胞异常积累,骨痂中软骨区域较 GIT1-WT 小鼠大(图 1)。

骨折后 2 周,p-Smad1/5/8 的免疫组织化学染色结果显示:GIT1-WT 小鼠骨痂区中 p-Smad1/5/8 阳性细胞比率(0.480 ± 0.024)明显高于 GIT1-KO 小鼠阳性细胞比率(0.150 ± 0.026 , $P < 0.05$,图 2)。

2.2 体外实验

2.2.1 GIT1-KO 小鼠骨髓间充质干细胞中 p-Smad1/5/8 表达量降低

取 GIT1-KO 及 GIT1-WT 小鼠 BMSCs 体外培

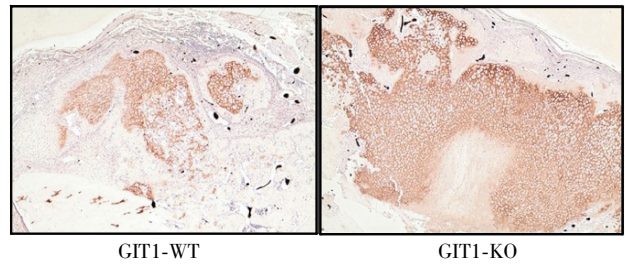


图 1 小鼠股骨干骨折后 2 周骨痂区 II 型胶原免疫组化($\times 100$)
Figure 1 Immunohistochemical staining of mouse tissue at the fracture site using cunicollagen type II antibody two weeks after femoral fracture($\times 100$)

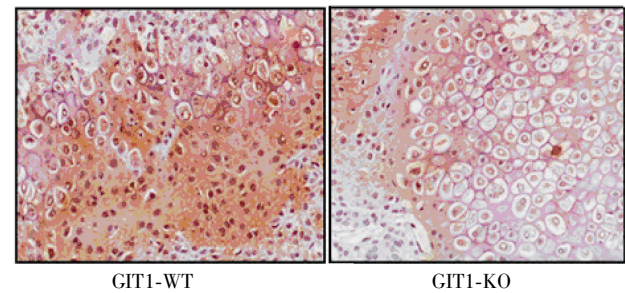
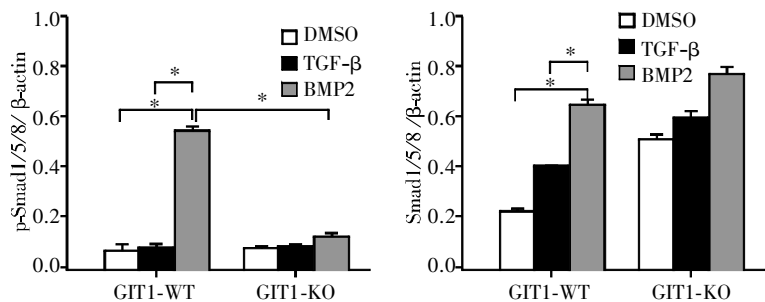
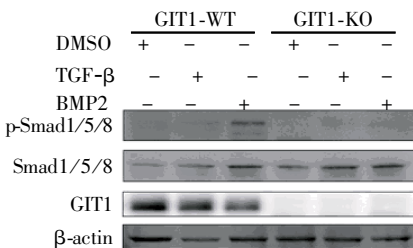


图 2 小鼠股骨干骨折后 2 周骨痂区 p-Smad1/5/8 免疫组化($\times 200$)
Figure 2 Immunohistochemical staining of p-Smad1/5/8 at the fracture site two weeks after femoral($\times 200$)

养,并给予 BMP2 刺激后检测 p-Smad1/5/8 的表达。结果表明,在 GIT1-WT 小鼠中,BMP2 能明显提高 p-Smad1/5/8 的表达水平,其表达水平显著高于 GIT1-KO 小鼠($P < 0.05$,图 3),TGF- β 无明显作用。

2.2.2 GIT1-KO 小鼠骨髓间充质干细胞中 p-Smad1/5/8 核转位能力下降

为了进一步阐明 GIT1 对 BMP2 信号转导途径的作用,分别检测了 2 组小鼠 BMSCs 在受到 BMP2 刺激 0 和 5 min 后,p-Smad1/5/8 转位到核内的能力,结果表明:GIT1-WT 小鼠 BMSCs 在受到 BMP2 刺激后大量 p-Smad1/5/8 转位到细胞核内;而 GIT1-KO 小鼠水平转位到细胞核内的 p-Smad1/5/8 显著降低(图 4)。



* $P < 0.05$, $n=15$ 。

图 3 Western blot 检测 BMP2 刺激下 GIT1-WT 及 GIT1-KO 小鼠 p-Smad1/5/8 表达

Figure 3 The results of Western blot assay of p-Smad1/5/8 after TGF β and BMP2 promoted in the GIT1-KO and GIT1-WT

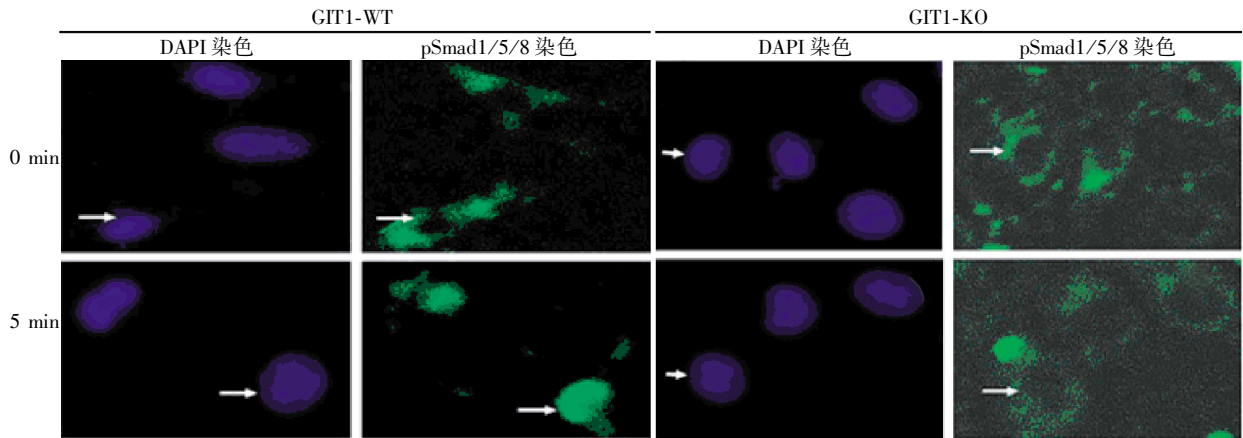


图 4 免疫荧光检测 BMP2 刺激下 GIT1-WT 及 GIT1-KO 中 p-Smad1/5/8 的核转位能力(×200)

Figure 4 The results of immunofluorescence assay of p-Smad1/5/8 after BMP2 promoted in the GIT1-KO and GIT1-WT(×200)

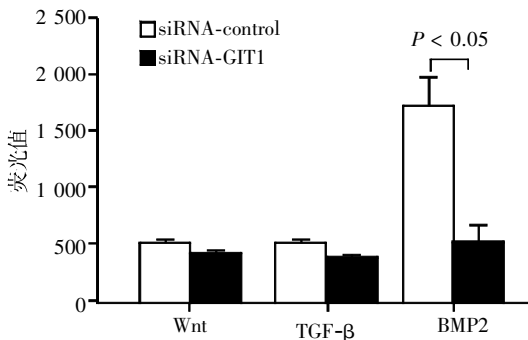


图 5 荧光素酶报告基因分析结果

Figure 5 Smad binding element reporter gene assay

2.2.3 荧光素酶报告基因分析结果

荧光素酶报告基因分析结果表明:细胞内 GIT1 蛋白对 BMP2 的转录水平影响显著,其中对照组荧光值是 $1\ 978.00 \pm 27.35$; siRNA-GIT1 组是 516.00 ± 57.18 ($P < 0.05, n=5$),而对 Wnt 信号和 TGF- β 的转录无明显作用 ($P > 0.05, n=5$,图 5)。

3 讨论

GIT1 是广泛分布于细胞内的穿梭蛋白,通过其自身结构与其他蛋白质结合,并进一步调节细胞功能^[12]。GIT1 基因敲除可致血管内皮生长因子分泌紊乱而引起肺血管发育异常。本课题组最近研究表明:通过与 FAK、ERK1/2 结合,GIT1 可调节骨折区域血小板衍生生长因子(PDGF)诱导血管生成,从而促进骨折愈合^[13-14]。在血供充分的情况下,BMP2 可促进软骨样组织向骨组织的转化和成熟^[15]。因此,本文推测 GIT1 可能通过增加骨折部位血管生成,加强 BMP2 信号转导,促进软骨细胞的分化成熟,从而促进骨折愈合。软骨细胞分化和成熟是骨组织正常发育的关键,TGF- β 超家族在此过程中发挥着极为重

要的作用。TGF- β 超家族有 30 多个成员,包括 TGF- β s、BMPs、GDFS、Nodal、活化素、抑制素等。这些信号分子作用于 I 型和 II 型跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体激活不同的信号途径:经典 Smads 通路和非经典丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径。与配体结合后,受体形成异二聚体并使得受体依赖型 Smad 蛋白(R-Smads)激活。R-Smad 蛋白聚集并结合共用 Smad 蛋白(Co-Smad 蛋白,即 Smad4 蛋白)形成异二聚体,然后进入细胞核,调节靶基因的转录。BMP 信号通路可诱导软骨细胞分化和成熟,且此过程与 Smad1/5/8 磷酸化密切相关。本研究的实验结果表明:GIT1 基因敲除小鼠的 BMP2/p-Smad1/5/8 信号转导显著减弱,p-Smad1/5/8 表达明显下降,导致软骨细胞分化成熟障碍和软骨细胞大量堆积,延迟骨折愈合。这表明 GIT1 可能通过影响 BMP2/p-Smad1/5/8 信号转导,调节软骨细胞的成熟和软骨内骨化。

本课题组前期研究结果表明:GIT1 基因敲除小鼠表现出血管内皮生长因子(VEGF)分泌紊乱而引起肺血管发育异常,而通过结合 FAK 和 ERK1/2,GIT1 可调节骨折区域 PDGF 诱导的血管生成,从而促进骨折愈合。在血液供应充足的情况下,BMP2 促进早期软骨样组织朝向骨组织的发展。同时证实,GIT1/MEK1/ERK1/2 复合体可以加强血管紧张素 II 和表皮生长因子刺激后 ERK1/2 的活性。由于蛋白激酶 C δ (PKC δ)可促使 GIT1 磷酸化,因此 PKC δ 亦可能参与了 GIT1 对 p-Smad1/5/8/Runx2 的调节^[7]。因此推测,除了 BMP/Smad1/5/8 通路,GIT1 可能通过并行 MAPK 途径影响软骨发育和软骨内成骨;同时 GIT1 亦可能通过血管生成和 PKC δ 途径调节 Runx2 的表达,从而影响软骨细胞的分化和成熟。因此,GIT1 调节骨折愈合的确切机制仍需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, et al. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation [J]. *J Cell Biol*, 2003, 88(5): 873-884
- [2] 郝思春, 蒋建农, 周建刚, 等. 兔髓基质干细胞复合珊瑚修复兔骨缺损的实验研究[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2006, 26(6): 846-848
- [3] 胡兆兴, 王维东, 范军届, 等. 内源性甲状旁腺激素促进小鼠骨折愈合[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2014, 34(4): 457-461
- [4] Lo YC, Chang YH, Wei BL, et al. Betulinic acid stimulates the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells: involvement of BMP/Runx2 and beta-catenin signals[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(11): 6643-6649
- [5] Hoefen RJ, Berk BC. The multifunctional GIT family of proteins[J]. *JCS*, 2006, 119(8): 1469-1475
- [6] Pang J, Yan C, Natarajan K, et al. GIT1 mediates HDAC5 activation by angiotensin II in vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(5): 892-898
- [7] Menon P, Yin G, Smolock EM, et al. GPCR kinase 2 interacting protein 1 (GIT1) regulates osteoclast function and bone mass[J]. *JCP*, 2010, 225(3): 777-785
- [8] Rui Z, Li X, Fan J, 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(4): 819-825
- [9] Wang J, Yin G, Menon P, et al. Phosphorylation of G protein-coupled receptor kinase 2-interacting protein 1 tyrosine 392 is required for phospholipase C-gamma activation and podosome formation in vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(10): 1976-1982
- [10] Marturano JE, Cleveland BC, Byrne MA, et al. An improved murine femur fracture device for bone healing studies[J]. *J Biomech*, 2008, 41(6): 1222-1228
- [11] 宋会平, 王志强, 赵亚平, 等. 血小板裂解液对大鼠 BMSCs 成骨分化的干预效应[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2008, 22(6): 737-741
- [12] Premont RT, Claing A, Vitale N, et al. Beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein[J]. *PNAS*, 1998, 95(24): 14082-14087
- [13] Yin G, Haendeler J, Yan C, et al. GIT1 functions as a scaffold for MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation by angiotensin II and epidermal growth factor [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(2): 875-885
- [14] Sheu TJ, Zhou W, Fan J, et al. Decreased BMP2 signal in GIT1 knockout mice slows bone healing[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 397(1-2): 67-74
- [15] Ren Y, Yu L, Fan J, et al. Phosphorylation of GIT1 tyrosine 321 is required for association with FAK at focal adhesions and for PDGF-activated migration of osteoblasts [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 365(1-2): 109-118

[收稿日期] 2015-03-09

本刊邮发代号 28-61

网址: <http://jnm.njmu.edu.cn>