

· 综述 ·

Wnt 信号通路在骨折愈合过程中作用与机制的研究进展

王晨光 张华峰 李稚君 李晖

【摘要】 Wnt 信号通路在骨折修复过程中对骨骼发育和骨组织内稳态具有重要作用, 本文综述了当前 Wnt 信号通路在骨折修复过程中的作用与机制, 涉及各种成骨细胞与调节因子的相互作用, Wnt 信号有助于加速骨修复, 其抑制剂和中和抗体可能成为骨修复中最有前途的治疗药物, 为骨折优化治疗提供参考。

【关键词】 Wnt 信号通路; 骨折愈合

Effect and mechanism of the Wnt signaling pathway in fracture healing Wang Chenguang, Zhang Huafeng, Li Zhijun, Li Hui. Department of Orthopaedics, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Corresponding author: Li Hui, Email: hantsontijmu@163.com

【Abstract】 In the process of fracture repairing, Wnt signaling pathway plays an important role in bone development and bone tissue homeostasis. We reviewed the current view of Wnt signaling pathway in fracture repairing, involving various interactions and regulation of bone cell activating factors. Wnt signaling contribute to bone repair, the inhibitors and neutralizing antibodies, that might become the most promising medicine and provide references for fracture healing.

【Key words】 Wnt proteins; Fractures healing

骨组织作为可再生组织, 骨折后能够进行自我修复。然而有数据显示, 3% ~ 10% 的患者骨折后发生延迟愈合和骨不连^[1]。据统计美国每年约有 100 000 例骨折患者存在骨不连^[2], 因此找到新的合成药物促进骨再生和修复, 改善骨折疗效已迫在眉睫。骨折愈合是一个复杂的生理过程, 涉及不同类型的骨细胞和细胞间及生长因子和细胞外基质等因素的相互作用包括 4 个阶段: 炎症反应(也称为血肿形成)阶段、纤维愈合形成阶段、硬组织形成阶段和骨重塑阶段^[3]。在这个过程中, 骨细胞按顺序激活形成新骨, 骨折后血肿形成, 导致骨髓间充质干细胞被募集增殖分化成软骨细胞和成骨细胞。软骨细胞形成一个软骨痂组织的稳定结构, 随后组织矿化, 软骨内骨化, 同时成骨细胞矿化, 通过膜内的骨化生成一个硬结。最后, 破骨细胞和成骨细胞负责骨重塑过程, 建立新生骨组织^[3-6]。成骨细胞分化成熟对于骨重建具有重要影响。近年研究表明, 多种信号转导通路和细胞因子参与成骨细胞分化的调控, 其中

Wnt 信号通路在骨骼发育和骨组织内稳态中起到重要作用^[7-8], 骨折修复过程与胚胎骨骼发育很相似, Wnt 信号通路在胚胎骨骼发育中具有重要作用^[9], 因此, 越来越多的研究集中在 Wnt 信号通路在骨折愈合中的作用^[7]。

一、Wnt 信号通路

Wnt 基因是由果蝇的 Wingless 基因和小鼠乳腺癌基因的 Int-1 联合命名而来^[10-11]。Wnt 家族分泌蛋白在胚胎发育、骨代谢和其他重要的生理过程中扮演关键角色。目前为止, 19 种不同的 Wnt 蛋白质已在人和老鼠体内发现, 包括 WNT1-WNT11, WNT16 等^[12]。Wnt 信号通路参与调节多种生物过程, 包括干细胞的自我更新及 T 细胞的增殖分化等。经典 Wnt 信号通路中, Wnt 蛋白与细胞膜上的 7 次跨膜蛋白 Frizzled (Fzd) 受体连接, 结合低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 和 6 (LDL receptor related protein 5 and 6, LRP 5 and 6) 激活 Dsh 蛋白^[13], 与相关受体结合抑制糖原合成酶激酶 3 β (Glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 的活性, 未激活的 GSK-3 β 无法使 β -catenin 磷酸化, 导致未激活的 β -catenin 被蛋白酶体降解并转移到核内, 与转录因子 T 细胞因子 7 (T cell transfer factor 7, Tcf 7) 和淋巴增强因子 1 (Lymphoid enhancer factor-1, Lef 1) 结合, 从而调节一系列基因表达^[14], 见图 1。在非经典的 Wnt 信号通路中, 钙离子信号起传递作用^[14], Wnt 和 Fzd 相互结合形成一种

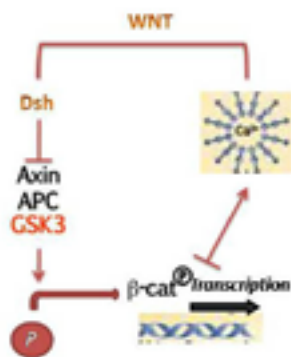


图 1 Wnt 信号通路简略示意图

Dsh-Axin-GSK 三蛋白复合体结构，介导酪氨酸激酶跨膜受体 1/2 (Ror1/2) 的磷酸化。Wnt 与 Fzd、Ror1/2 结合激活的磷脂酶 C (Phospholipase C, PLC)，导致三磷酸肌醇 (Inositol triphosphate, IP₃)，1、2 甘油二酯 (Diacylglycerol, DAG)，细胞内钙的浓度增加，从而使下游细胞功能改变^[15]。此外一些分泌性蛋白质，如抑制因子 (Dickkopf, Dkk)、硬化蛋白 (Sclerostosis, Sost) 和分泌卷曲蛋白 (Secreted Frizzled Related Protein, Sfrp)，可能与 LRP5/6 或 Fzd 受体相互作用，作为拮抗剂抑制 Wnt 信号通路^[16-17]。

二、Wnt 关键蛋白与骨折愈合

在骨折修复过程中，许多 Wnt 配体 (WNT45b、10b、11、13) 和受体 Fz1, 2, 4, 5 的表达上调^[18]，一些 Wnt 通路的靶蛋白质被激活，如原癌基因 (c-myc) 和联接蛋白 43 (connexin 43) 等^[19]。这些研究结果显示 Wnt 信号通路在骨折修复过程中对调节骨形成起重要作用。

(一) β-catenin 蛋白

在缺少 Wnt 蛋白的情况下，细胞中的 β-catenin 降解复合物，能够通过调节胞质中 β-catenin 的磷酸化以及泛素化降解对细胞 β-catenin 的浓度进行调控。当细胞分泌 Wnt 配体与细胞膜跨膜受体及协同受体结合后，能够引起蛋白的招募及 β-catenin 降解复合体的破坏。这导致了胞质中 β-catenin 积累，从而促进其进入细胞核，并与细胞核中转录因子结合，使下游相关靶基因得到转录和翻译表达。β-catenin 降解复合体在 Wnt 信号通路的监控和稳定 β-catenin 浓度方面发挥了至关重要的作用。很多研究表明 β-catenin 蛋白信号可在骨折处被激活^[20]。Chen 等^[18]研究发现骨折修复整个期间 β-catenin 高度表达。在治疗的早期阶段，β-catenin 控制间叶组织细胞的分化，分化为成骨细胞和软骨细胞。在骨折的早期阶段 β-catenin 增加或减少影响骨折的愈合。在骨折后期，当骨髓间充质干细胞已经变成成骨细胞时，β-catenin 还可以促进成骨细胞增殖分化及骨折后期的愈合^[18]。

(二) GSK-3β

GSK-3β 抑制剂 - 氯化锂的使用证实了 GSK-3β 在骨折愈

合中的功能可以激活 Wnt 信号并加速骨折修复^[21]。然而，这种效应只发生在间充质干细胞分化成骨细胞后的骨折修复晚期阶段。在骨折早期使用锂治疗，未分化间充质细胞的聚集减少骨折形成^[18]。在酒精性股骨头坏死治疗模型中，GSK-3β 抑制剂中和了酒精破坏性影响，恢复软骨内骨化和软骨内成骨的形成^[22]。临床上氯化锂可用来降低骨折风险^[22]。口服一种 GSK3 抑制剂 AZD2858，可增加骨折愈合处的力学性质并加速了骨折愈合^[23]。

(三) Sfrp1

Sfrp1 与 Fzd 或 Wnt 直接作用，拮抗经典 Wnt 信号通路^[24]。骨形成早期在 Wnt 依赖途径中 Sfrp 的表达增加，并伴随 β-catenin 的表达增强，Sfrp1 基因缺陷鼠域骨密度、骨体积和矿化程度在骨小梁区均有增加，但在皮质区域并无增加^[24]。基因分析显示骨折后第 4 天 Sfrps 的表达明显降低。然而，在骨折后 8 d 和 14 d，Sfrp1 和 Sfrp4 在受伤部位对骨形成起负调节作用。体外实验 Sfrp1 功能的损失，提高了骨折修复中祖细胞向成骨细胞的直接转化，促进了早期骨愈合。骨折后第 14 天 Sfrp1 基因敲除小鼠表现出软骨瘤和膜内骨形成戏剧性减少的现象。在骨折后第 28 天表现出骨重塑，较野生型小鼠出现的更早^[25]。

(四) LRP5 和 LRP6

骨组织中，Sost 是一个主要由骨细胞分泌的糖蛋白，与细胞外 LRP5 和 LRP6 结合干扰了 Wnt-LRP 复合体的形成^[26]。Sost 基因敲除增加了小鼠的骨密度、骨体积、骨形成和骨强度^[27]。但这些老鼠有骨折愈合缺陷，可能由骨皮质的厚度和成骨细胞的数目增加造成^[28]。Sarahrudi^[29]等证明了在人类骨折修复中 Sost 蛋白分泌明显增加。在一些包括小鼠、大鼠和猕猴等动物骨折模型中使用 Sost 中和抗体明显增加骨形成^[27, 30]。抗体治疗能改善骨密度和无骨折骨骼的强度^[31]。Sost 抗体疗法在骨质疏松症和骨折愈合上是一种很有前途的方法。

在骨折修复过程中必需有 LRP5/6 的参与。LRP6 基因的突变将导致骨量和骨密度的下降，基因突变增加成年澳大利亚人种女性^[32]和高加索人种男性^[33]骨折的风险。LRP5 基因突变小鼠引起了下颌骨折延迟愈合^[34]。LRP5 基因敲除小鼠在骨折修复过程中表现出受损，骨痂区域减少，骨矿化量和骨密度的降低，及生物力学等特性的变化^[21]。

(五) DKK1 抑制剂

Dickkopf1 (Dkk1) 与 Lrp5/6 结合，阻断了 Wnt 信号通路，Dkk1 等位基因缺失小鼠的骨量增加但不影响骨吸收过程^[35]。Kim 等^[36]证明使用表达 Dkk1 腺病毒可有效阻止骨原细胞的分化和受伤部位骨的形成。而且，Dkk1 导致在骨折部位出现大量未分化的类间充质组织，同时减少了软骨细胞分化^[25]。只有术后第一天使用 Dkk1 抗体明显促进骨折修复^[21]。对 Dkk1 拮抗使骨折处骨强度增高^[37]。

(六) Notch/Wnt 信号通路的交叉作用

另有研究表明 RBP-J/ β -catenin 的相互作用可以发生在一些靶位基因中并产生协同支持血管生成的作用^[38]。丝氨酸 / 苏氨酸激酶 GSK3 β 能够介导 β -catenin 磷酸化并促进其降解过程, 而在 Wnt 和 Notch 信号通路的相互影响中也发挥了重要作用^[39]。值得注意的是, GSK3 β 磷酸化 NICD-1 丝氨酸和苏氨酸残基, 能够导致 NICD-1 入核及核定植增强, 从而使其稳定性和转录活性升高^[40]。GSK3 β 同样也能够磷酸化 NICD-2, 但与 NICD-1 相比, GSK3 β 依赖的 NICD-2 磷酸化会导致其转录活性的降低。因此对于 NICD-1 或 NICD-2 的磷酸化可能会出现不同的结果并可能存在细胞间的特异性^[41], 简略示意图如图 2。非经典的 Wnt/ Ca^{2+} 信号通路中, Wnt 信号受体 Frizzled 调控了 Ca^{2+} 从内质网释放的过程, 这一过程能够活化钙 / 钙调蛋白依赖蛋白激酶 II^[42]。Wnt5a 作为 Wnt 信号通路典型配体蛋白, 能够活化 β -catenin 依赖和非 β -catenin 依赖的 Wnt 信号通路, 而 Wnt5a 会诱导 RBP-J- 共阻遏物 SMRT 的磷酸化, 从而导致了其启动子活性的增强^[43]。

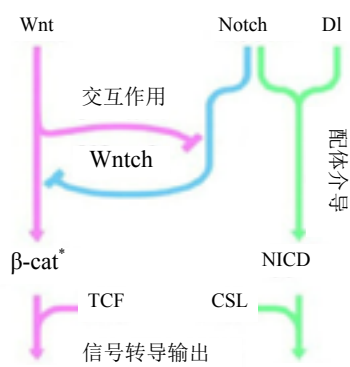


图 2 Notch/Wnt 信号通路的交叉作用

综上所述, 激活 Wnt 信号有助于加速骨修复, 变异的 β -catenin 蛋白和 LRP5/6 蛋白阻碍了骨的愈合。此外, 抑制 Wnt 信号通路中的负调节蛋白, 如 GSK-3 β 和 Sost 蛋白, 可提高骨折部位骨的形成。因此, GSK-3 β 抑制剂和 Sost 中和抗体可能成为骨修复中最有前途的治疗药物。随着医学界对 Wnt 信号通路及主要分子的深入研究, 调控该传导通路不同靶点的药物将不断涌现, 将为促进骨折愈合, 降低骨折致残率提供新的策略。

参考文献

- 1 Tzioupis C, Giannoudis PV. Prevalence of long-bone non-unions [J]. Injury, 2007, 38(Suppl 2): S3-S9.
- 2 Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, et al. Delayed union and

- nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects [J]. Injury, 2014, 45(Suppl 2): S3-S7.
- 3 O'Connor JP, Manigrasso MB, Kim BD, et al. Fracture healing and lipid mediators [J]. Bonekey Rep, 2014, 3: 517.
- 4 Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing [J]. Injury, 2011, 42(6): 551-555.
- 5 Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, et al. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture [J]. Semin Cell Dev Biol, 2008, 19(5): 459-466.
- 6 Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade [J]. Injury, 2005, 36(Suppl 3): S5-S7.
- 7 Regard JB, Zhong Z, Williams BO, et al. Wnt signaling in bone development and disease: making stronger bone with Wnts [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 4(12): a007997.
- 8 Chen Y, Alman BA. Wnt pathway, an essential role in bone regeneration [J]. J Cell Biochem, 2009, 106(3): 353-362.
- 9 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): 413-419.
- 10 Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila [J]. Nature, 1980, 287(5785): 795-801.
- 11 Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, et al. The drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless [J]. Cell, 1987, 50(4): 649-657.
- 12 Nusse R, Varmus H. Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed [J]. EMBO J, 2012, 31(12): 2670-2684.
- 13 Zhang Y, Yeh LK, Zhang S, et al. Wnt/ β -catenin signaling modulates corneal epithelium stratification via inhibition of Bmp4 during mouse development [J]. Development, 2015, 142(19): 3383-3393.
- 14 De A. Wnt/ Ca^{2+} signaling pathway: a brief overview [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011, 43(10): 745-756.
- 15 Spreafico A, Tentler JJ, Pitts TM, et al. Rational combination of a MEK inhibitor, selumetinib, and the Wnt/Calcium pathway modulator, cyclosporin A, in preclinical models of colorectal cancer [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(15): 4149-4162.
- 16 Nakamura RE, Hackam AS. Analysis of dickkopf3 interactions with Wnt signaling receptors [J]. Growth Factors, 2010, 28(4): 232-242.
- 17 Wagner FF, Bishop JA, Gale JP, et al. Inhibitors of glycogen synthase kinase 3 with exquisite Kinome-Wide selectivity and their functional effects [J]. ACS Chem Biol, 2016[Epub ahead of print].
- 18 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.
- 19 Zhong N, Gersch RP, Hadjiargyrou M. Wnt signaling activation during bone regeneration and the role of Dishevelled in chondrocyte proliferation and differentiation [J]. Bone, 2006, 39(1): 5-16.
- 20 Macsai CE, Georgiou KR, Foster BK, et al. Microarray expression analysis of genes and pathways involved in growth plate cartilage injury responses and bony repair [J]. Bone, 2012, 50(5): 1081-1091.
- 21 Komatsu DE, Mary MN, Schroeder RJ, et al. Modulation of Wnt signaling influences fracture repair [J]. J Orthop Res, 2010, 28(7): 928-936.
- 22 Lauring KL, Sundaramurthy S, Nauer RK, et al. Exogenous activation of Wnt/ β -catenin signaling attenuates binge alcohol-induced deficient bone fracture healing [J]. Alcohol Alcohol, 2014, 49(4): 399-408.
- 23 Sisask G, Marsell R, Sundgren-Andersson A, et al. Rats treated with AZD2858, a GSK3 inhibitor, heal fractures rapidly without endochondral bone formation [J]. Bone, 2013, 54(1): 126-132.

- 24 Yang Y, Sun W, Wang R, et al. Wnt antagonist, secreted frizzled-related protein 1, is involved in prenatal skeletal muscle development and is a target of miRNA-1/206 in pigs [J]. BMC Mol Biol, 2015, 8(16): 4.
- 25 Gaur T, Wixted JJ, Hussain S, et al. Secreted frizzled related protein 1 is a target to improve fracture healing [J]. J Cell Physiol, 2009, 220(1): 174-181.
- 26 Li X, Ominsky MS, Niu QT, et al. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength [J]. J Bone Miner Res, 2008, 23(6): 860-869.
- 27 Mcgee-Lawrence ME, Ryan ZC, Carpio LR, et al. Sclerostin deficient mice rapidly heal bone defects by activating β -catenin and increasing intramembranous ossification [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 441(4): 886-890.
- 28 Li C, Ominsky MS, Tan HL, et al. Increased callus mass and enhanced strength during fracture healing in mice lacking the sclerostin gene [J]. Bone, 2011, 49(6): 1178-1185.
- 29 Sarahrudi K, Thomas A, Albrecht C, et al. Strongly enhanced levels of sclerostin during human fracture healing [J]. J Orthop Res, 2012, 30(10): 1549-1555.
- 30 Suen PK, He YX, Chow DH, et al. Sclerostin monoclonal antibody enhanced bone fracture healing in an open osteotomy model in rats [J]. J Orthop Res, 2014, 32(8): 997-1005.
- 31 Ominsky MS, Li C, Li X, et al. Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody enhances bone healing and improves bone density and strength of nonfractured bones [J]. J Bone Miner Res, 2011, 26(5): 1012-1021.
- 32 Wolski H, Drwęska-Matelska N, Seremak-Mrozikiewicz A, et al. The role of Wnt/ β -catenin pathway and LRP5 protein in metabolism of bone tissue and osteoporosis etiology [J]. Ginek Pol, 2015, 86(4): 311-314.
- 33 Van Meurs JB, Rivadeneira F, Jhamai M, et al. Common genetic variation of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6 genes determines fracture risk in elderly white men [J]. J Bone Miner Res, 2006, 21(1): 141-150.
- 34 Leucht P, Kim JB, Helms JA. Beta-catenin-dependent Wnt signaling in mandibular bone regeneration [J]. J Bone Joint Surg Am, 2008, 90(Suppl 1): 3-8.
- 35 Morvan F, Boulukos K, Clément-Lacroix P, et al. Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass [J]. J Bone Miner Res, 2006, 21(6): 934-945.
- 36 Kim JB, Leucht P, Lam K, et al. Bone regeneration is regulated by wnt signaling [J]. J Bone Miner Res, 2007, 22(12): 1913-1923.
- 37 Hsu YH, Chiu YS, Chen WY, et al. Anti-IL-20 monoclonal antibody promotes bone fracture healing through regulating IL-20-mediated osteoblastogenesis [J]. Sci Rep, 2016, 14(6): 24339.
- 38 Duan P, Bonewald LF. The role of the wnt/ β -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, 77(Pt A): 23-29.
- 39 Ann EJ, Kim HY, Seo MS, et al. Wnt5a controls Notch1 signaling through CaMKII-mediated degradation of the SMRT corepressor protein [J]. J Biol Chem, 2012, 287(44): 36814-36829.
- 40 Germar K, Dose M, Konstantinou T, et al. T-cell factor 1 is a gatekeeper for T-cell specification in response to Notch signaling [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(50): 20060-20065.
- 41 Wang H, Zou J, Zhao B, et al. Genome-wide analysis reveals conserved and divergent features of Notch1/RBPJ binding in human and murine T-lymphoblastic leukemia cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(36): 14908-14913.
- 42 Chen X, Stoeck A, Lee SJ, et al. Jagged1 expression regulated by Notch3 and Wnt/ β -catenin signaling pathways in ovarian cancer [J]. Oncotarget, 2010, 1(3): 210-218.
- 43 Collu GM, Hidalgo-Sastre A, Acar A, et al. Dishevelled limits Notch signalling through inhibition of CSL [J]. Development, 2012, 139(23): 4405-4415.

(收稿日期: 2016-03-28)
(本文编辑: 宇文培之)

王晨光, 张华峰, 李稚君, 等. Wnt 信号通路在骨折愈合过程中作用与机制的研究进展 [J/CD]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2016, 2(3): 189-192.