

尿囊素促进破骨细胞缺陷斑马鱼骨折修复

李凯伦, 卢荆奥, 陈小辉, 张文清, 刘伟

华南理工大学医学院发育生物学与再生医学团队, 广州 510006

摘要: 骨折愈合是一个由多细胞介导的多步骤的严密有序的过程, 其中破骨细胞介导的骨重塑在骨折愈合中具有关键作用, 其生成减少或者功能障碍不仅导致骨折的易发生, 还会引起骨折愈合障碍。但是, 目前关于破骨细胞缺陷所致的骨折愈合障碍的研究较少, 并且临床上尚缺乏针对破骨细胞缺陷所致骨折愈合障碍的治疗药物。斑马鱼(*Danio rerio*)骨骼系统中的细胞类型和调节途径与哺乳动物高度相似, 使得其被广泛地运用于骨骼相关的研究。为了研究破骨细胞缺陷所致的骨折愈合障碍过程以及寻找有潜力的治疗药物, 本研究使用前期建立的 *fms* 基因突变斑马鱼(*fms^{Δel}*)构建了体内破骨细胞缺陷骨折模型, 结果发现功能性破骨细胞减少可在骨折早期影响骨折的愈合; 使用离体鳞片培养系统用于筛选破骨细胞靶向药物, 获得了可以激活破骨细胞的小分子化合物尿囊素(allantoin, ALL); 随后, 在体内 *fms^{Δel}* 骨折缺陷模型中验证了 ALL 对破骨细胞的激活作用以及对骨折修复的促进作用; 最后, 通过对破骨细胞生成和成熟过程的分析, 发现 ALL 可能通过调节 RANKL/OPG 来促进破骨细胞的成熟, 从而促进 *fms^{Δel}* 骨折愈合。本研究为未来改善破骨细胞缺陷引起的骨折愈合障碍提供了潜在的新方法。

关键词: 斑马鱼 *fms^{Δel}* 突变体; 破骨细胞; 药物筛选; 尿囊素; 骨折愈合

The role of the allantoin in promoting fracture healing in osteoclast-deficient zebrafish

Kailun Li, Jingao Lu, Xiaohui Chen, Wenqing Zhang, Wei Liu

Division of Development Biology & Regenerative Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

Abstract: Fracture healing is a rigorous and orderly process with multiple steps that are mediated by multiple cells. During this process, osteoclast-mediated bone remodeling plays a critical role, and its abnormal activity leads not only to fracture susceptibility but also to impaired fracture healing. However, few studies have focused on impaired healing caused by osteoclast defects, and clinical drugs for this type of impaired fracture healing are still lacking. The cell types and regulatory pathways in the zebrafish skeletal system are highly similar to those of mammals, making the zebrafish skeletal system being widely used for skeletal-related studies. To study the process of fracture healing disorders caused by

收稿日期: 2023-01-18; 修回日期: 2023-02-27; 网络发布日期: 2023-03-22

基金项目: 国家重点研发计划(编号: 2018YFA0801000)和国家自然科学基金项目(编号: 81770167)资助[Supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0801000) and the National Natural Science Foundation of China (No.81770167)]

作者简介: 李凯伦, 本科, 专业方向: 临床医学。E-mail: mckailun123@mail.scut.edu.cn

通讯作者: 刘伟, 博士, 副教授, 研究方向: 人类疾病斑马鱼动物模型的建立、造血发育以及调控。E-mail: liuwe7@scut.edu.cn

张文清, 博士, 教授, 研究方向: 人类疾病斑马鱼动物模型的建立、造血发育以及调控。E-mail: mczhangwq@scut.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.23-015

osteoclast defects and discover potential therapeutic drugs, we established an *in vivo* osteoclast-deficient fracture model using a previously generated *fms* gene mutant zebrafish (*fms^{Δel}*). The results showed that reduced functional osteoclasts could affect fracture repair in the early stages of fracture. Then we applied an *in vitro* scale culture system to screen for osteoclast-activating drugs. We found the small molecule compound allantoin (ALL) being able to activate osteoclasts. Subsequently, we verified the activation role of ALL on osteoclasts and the promotion of fracture repair in an *in vivo fms^{Δel}* fracture defect model. Finally, by examining the osteoclastogenesis and maturation process, we found that ALL may promote osteoclast maturation by regulating RANKL/OPG, thus promoting *fms^{Δel}* fracture healing. Our study provides a potential new approach for the future improvement of fracture healing disorders caused by osteoclast defects.

Keywords: zebrafish *fms^{Δel}* mutant; osteoclasts; drug screening; allantoin; fracture healing

骨折是由创伤引起的常见的骨骼疾病, 现已成为重大的公共健康事件与社会经济负担^[1]。尽管治疗方法不断改进, 但仍有 10% 的骨折患者表现出骨折愈合延迟乃至不愈合的情况, 最终导致患者生活质量显著下降^[2,3]。骨折愈合过程复杂, 大致可分为急性充血水肿期、急性炎症反应期、肉芽组织期、骨痂形成期与骨痂重构期 5 个时期^[4]。整个过程精密有序, 多种细胞与细胞因子参与其中。破骨细胞作为骨吸收的关键细胞, 不仅参与骨折早期破碎骨组织的清理, 还参与骨折愈合后期的骨痂形成与骨痂重塑^[5,6]。临床研究显示, 破骨细胞减少或功能障碍可导致骨质疏松症或致密性成骨不全^[7,8]。患有这类疾病的病人易出现骨损伤, 存在骨折延迟愈合乃至不愈合的情况^[7]。然而, 目前临床上尚缺乏治疗破骨细胞缺陷所致骨折愈合障碍的药物。

破骨细胞是一种负责骨吸收的组织驻留巨噬细胞, 起源于造血干细胞来源的单核细胞/巨噬细胞系^[9]。许多转录因子和细胞因子在破骨细胞形成和成熟过程中起着不可或缺的作用, 如巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF, 又叫 CSF-1)、巨噬细胞集落刺激因子受体(colony-stimulating factor 1 receptor, CSF1R, 又叫 C-FMS)以及核因子 κ B 活化因子受体配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)^[10,11]。C-FMS 是一种 III 型受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK), 其与集落刺激因子 M-CSF 结合后可刺激核因子 κ B 活化因子受体(receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK)的表达^[12]。RANK 是一种 I 型跨膜蛋白, 属于肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,

TNF)受体超家族成员, 它高度表达在破骨细胞祖细胞和成熟破骨细胞的细胞膜上, 而 RANKL 则为骨细胞中高表达的 TNF 相关活化诱导细胞因子, 在破骨细胞上 RANK 与其配体 RANKL 结合后激活 TNF 受体相关因子(TNF receptor-associated factors, TRAFs)家族, 通过一系列的信号级联传导途径调节破骨细胞的生成、激活和存活^[13,14]。研究显示, CSF-1R 缺陷小鼠(*Mus musculus*)和斑马鱼(*Danio rerio*)会出现功能性破骨细胞数量的减少^[15-17]。更为重要的是, 对几个临床家系的研究发现, CSF-1R 双等位基因突变会导致严重的脑畸形和骨质疏松症^[18]。破骨细胞缺陷型斑马鱼为研究破骨细胞缺陷型骨折愈合的过程和治疗提供了合适的研究材料。

建立一种简单、快速、有效的动物模型系统, 将有利于筛选和评估候选化合物对破骨细胞缺乏性骨折愈合的疗效。尽管斑马鱼的骨骼比陆生脊椎动物薄, 嵌入的骨细胞少, 小梁少, 但斑马鱼骨骼系统中的细胞类型和调节途径与哺乳动物相似^[19]。而斑马鱼的尾鳍具有易操作性、透明性以及再生能力等, 这使得斑马鱼尾鳍被广泛用作骨骼研究的模型系统^[20]。而斑马鱼的尾鳍在挤压后表现出的骨折愈合反应与哺乳动物高度相似^[21,22]。斑马鱼尾鳍骨折的可操作性和高度保守的骨折愈合过程使其成为新药验证和评价的理想在体模型。

本研究首先使用斑马鱼离体鳞片培养体系筛选到可以显著提高破骨细胞活性的化合物尿囊素(allantoin, ALL)。ALL 是动植物体内的尿酸盐的代谢产物^[23], 也是美国食品药品监督管理局(the U.S. Food and Drug Administration, FDA)获批的药物, 可以通

过刺激成纤维细胞生长来提高动物创口愈合活性,因此可用作预防疤痕产生^[24]。目前尚无报道显示尿囊素可影响破骨细胞与成骨细胞。*fms^{j4e1}*突变体斑马鱼是在 C-FMS 第一激酶结构域上产生突变,从而其丧失酪氨酸激酶功能出现破骨细胞缺陷的表型。为了研究 ALL 对破骨细胞缺陷型骨折愈合的作用,本研究使用 *fms^{j4e1}* 骨折活体模型验证了 ALL 对于骨折修复过程中破骨细胞活性和骨折愈合的影响。结果表明 ALL 可通过增强 *rankl* 和抑制骨保护素 (osteoclastogenesis inhibitory factor, *opg*) 在 *fms^{j4e1}* 突变体中的表达来增加破骨细胞活性,并且在使用 28 天后 *fms^{j4e1}* 显示出骨折愈合恢复的趋势。本研究有望为破骨细胞缺陷导致的骨折不愈合或延迟愈合的患者提供新的治疗策略。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

本研究所使用的斑马鱼品系包括 AB 野生型 (wildtype, WT) 及 *fms^{j4e1}* 突变体^[25], 由华南理工大学医学院发育生物学与再生医学团队培育。

1.2 斑马鱼的饲养与胚胎孵育

所有的斑马鱼实验都在华南理工大学动物伦理委员会(批准代码: 20211067)的指导下进行。根据 Westerfield 书中所述,斑马鱼胚胎在 28.5°C 温度下,在添加美兰与苯基硫脲培养液里培养; 20 天至 4 个月大的斑马鱼饲养在温度 28.5°C、光照 14 h/黑暗 10 h 的流动水环境中^[26]。

1.3 斑马鱼尾鳍骨折

约 3 个月大小的 WT 和 *fms^{j4e1}* 突变体斑马鱼用 0.08% 三卡因麻醉,在显微镜下用镊子按压斑马鱼尾鳍的鳞质鳍条进行骨折。在每条鱼的尾鳍背侧及腹侧的第二条鳞质鳍条进行骨折,操作完后将骨折的斑马鱼放入鱼缸中培养。使用显微镜(德国 Zeiss 公司)拍照记录骨折愈合过程中斑马鱼尾鳍骨折点各个时期的状态。其中骨折后 0~3 dpi (day post injure) 的斑马鱼处于急性充血水肿和急性炎症反应期^[27],存在出血以及局部组织充血肿胀的情况,因此本研

究使用 4 dpi 作为骨折创面修复观察的起始时间点。

1.4 抗酒石酸酸性磷酸酶染色

用 4% 多聚甲醛(美国 Macklin 公司)4°C 过夜固定斑马鱼的尾鳍。固定好的样品需经双蒸水清洗 3 遍,每遍 10 min,然后放入混合的抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 染液中,在 37°C 孵育 45 min。抗酒石酸酸性磷酸酶染液的配比参照 TRAP/ALP 双重染色试剂盒(日本 WAKO 公司)说明书配置^[28]。9 mL 酸性磷酸酶底物液 A、1 mL 酒石酸溶液与 100 μL 酸性磷酸酶底物液 B 均匀混合,现配现用。染色完成后,样品用 PBST 冲洗 3 次,每次 5 min。染色后的尾鳍可以储存在 -20°C、70% 甘油中或直接在蔡司显微镜下观察。

1.5 鳞片培养及药物筛选

用 0.08% 三卡因麻醉受精 4 个月的 WT 斑马鱼。使用显微镊在解剖显微镜下从斑马鱼背侧收集鳞片,然后在 PBS 液中漂洗 3 次,每次 5 min。接着将鳞片放入含有 DMEM 培养基(10% FBS)和 DMSO 或者小分子化合物(筛选浓度: 100 μmol/L)的 48 孔板(美国 Sigma-Aldrich 公司)中培养。48 孔板置于 28°C 恒温箱中离体培养 24 h。然后去除培养基,用 PBST 冲洗鳞片 3 次,每次 5 min。最后,用 4% 的 PFA 在室温下固定鳞片 1 h,固定完后用去离子水冲洗 3 次,每次 5 min。随后,每孔加入 300 μL 的 TRAP 染色液,置于 37°C 恒温培养箱中染色 45 min。去除染色液,使用 PBST 冲洗后在显微镜(德国 Zeiss 公司)下拍照计数 TRAP 阳性信号。

1.6 药物处理骨折的斑马鱼

如上文 1.3 所述对 WT 和 *fms^{j4e1}* 突变体斑马鱼进行骨折,然后将骨折后的 WT 和 *fms^{j4e1}* 突变体斑马鱼随机放入实验组和对照组中。实验组设计为终浓度为 40 μmol/L 的尿囊素(美国 Selleck 公司)溶液,对照组为等体积的 DMSO(德国 Sigma 公司)溶液。在系统外饲养,一天喂一次,隔天换一次培养液。

1.7 原位杂交与免疫荧光染色

原位杂交的过程按照标准进行^[29],所用的地高辛标记的反义 RNA 探针 *mfap4* 由

ENSDART00000180647.1 的 cDNA 序列上+341~+1078 核苷酸编码而成, 而探针 *coll10a1* 由 ENSDART00000091021.5 的 cDNA 序列上+1108~+2075 核苷酸编码而成。Lcp 抗体免疫荧光染色中的抗体染色由抗 lcp 抗体去结合^[30], 由 1 : 400 的 AF555 驴抗兔抗体(美国 Thermo Fisher 科技公司)来显示。

1.8 总 RNA 的提取与实时荧光定量 PCR

将 4 个月大小的 WT 与 *fms^{j4el}* 突变体随机分入实验组与对照组, 药物处理 7 天后, 用 0.08% 三卡因将其麻醉, 拔取斑马鱼的鳞片。用 TRIzol(美国 Ambion 公司)提取斑马鱼鳞片总 RNA, 然后按照试剂盒(美国 Invitrogen 公司)说明书将其反转录成 cDNA。本研究经历 3 次生物学重复, 每次样品设置 3 个复孔, 每个引物 10 pmol, 采用 FastStart Universal SYBR Green Master(瑞士 Roche 公司)在 Light Cycler Nano(瑞士 Roche 公司)仪器上进行实时荧光定量 PCR 反应。以管家基因 *ef-1 α* 为内参, 使用 $\Delta\Delta Ct$ 阈值法将相对倍数变化标准化。引物由 Primer 5 设计, 引物序列信息见表 1。

1.9 统计学分析

采用 ImageJ 测量骨折处的骨折创面面积和 TRAP 阳性信号面积。每个样本的骨折创面面积与骨折处 TRAP 染色面积的数值取 2 个骨折点的测量数据的均值。使用 GraphPad Prism 8.3 软件进行统计数据的分析, 两组数据间的差异统计学意义通过双

尾 *t* 检验(Student *t* test)来计算, 而多组间的数据比较则采用单因素方差分析(one-way ANOVA)来统计。在所有图表中, 误差线反映的是 $\text{mean} \pm \text{SEM}$, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 建立 *fms^{j4el}* 斑马鱼破骨细胞缺陷骨折模型

为了阐明破骨细胞在骨折恢复过程中的作用规律, 本研究用镊子挤压 WT 斑马鱼尾鳍, 模拟骨折过程。然后通过 TRAP 染色检测骨折后 4 dpi、7 dpi、14 dpi、21 dpi、28 dpi 骨折处破骨细胞酸性磷酸酶 5a/b(acid phosphatase 5a/b, Acp5a/b)的酶活性变化。结果发现在正常的骨折愈合过程中, TRAP 染色阳性的破骨细胞活性在骨折愈合 7 dpi 达到高峰, 并在骨折愈合末期 21 dpi~28 dpi 降低(图 1, A 和 B)。前期研究显示, *Fms* 缺陷斑马鱼中破骨细胞出现成熟障碍^[17]。为了验证破骨细胞的 TRAP 活性是否在破骨细胞缺陷型骨折修复中受到影响, 本研究检测了 *fms^{j4el}* 突变体中骨折愈合不同阶段的骨折处破骨细胞活性。结果发现与 WT 相比, *fms^{j4el}* 突变体骨折处的 TRAP 阳性的信号在 4 dpi~28 dpi 的各个时期中均较野生型显著减少(图 1, A 和 B)。

为了进一步确定 *fms^{j4el}* 突变体中骨折部位破骨细胞活性的降低对骨折修复的影响, 本研究通过拍照计算了同一骨折处 WT 和 *fms^{j4el}* 在 4 dpi、7 dpi、14 dpi、21 dpi 和 28 dpi 骨折愈合情况。结果发现野生斑马鱼骨折后 4 dpi~28 dpi 时骨折创面逐渐减小, 42 dpi 完全愈合(图 1, C 和 D)。而 *fms^{j4el}* 骨折愈合速度与 WT 相比显著减慢, 并且 100% 的 *fms^{j4el}* 在 42 dpi 时仍未完全愈合(图 1, E 和 F)。以上数据表明, 破骨细胞的缺陷可以影响早期骨折愈合。

2.2 药物筛选发现 ALL 可增加离体培养的鳞片破骨细胞活性

为了寻找可以促进破骨细胞缺陷型骨折愈合的新药物, 首先需要筛选到可以提高破骨细胞活性的候选化合物。之前研究表明, 斑马鱼鳞片作为骨组织, 可以在 28°C、5%CO₂ 培养箱内进行 72 h 的离体培养^[31]。因此, 本研究拟利用鳞片培养系统作为初

表 1 本研究所用的引物信息

Table 1 The primer sequences used in this study

基因名称	引物序列(5'→3')
<i>colla</i>	F: CTGGAAACCGTGGTGAATCT
	R: GACCAGGATGTCCACGAAGT
<i>rankl</i>	F: TAGTGTGGCGATTCTGTTGC
	R: ATTGGAAGGTGAGCTGATGG
<i>opg</i>	F: GGCGTCTGAAGAAACCTCTG
	R: GCAGGATTGGGATGCAGTAT
<i>acp5b(trap)</i>	F: TGTCATCGTGGTTGGTCACT
	R: CTCAACACCAGCTCCACTGA
<i>ef-1α</i>	F: TACTTCTCAGGCTGACTGTG
	R: ATCTTCTTGATGTATGCGCT

F: 上游引物; R: 下游引物。

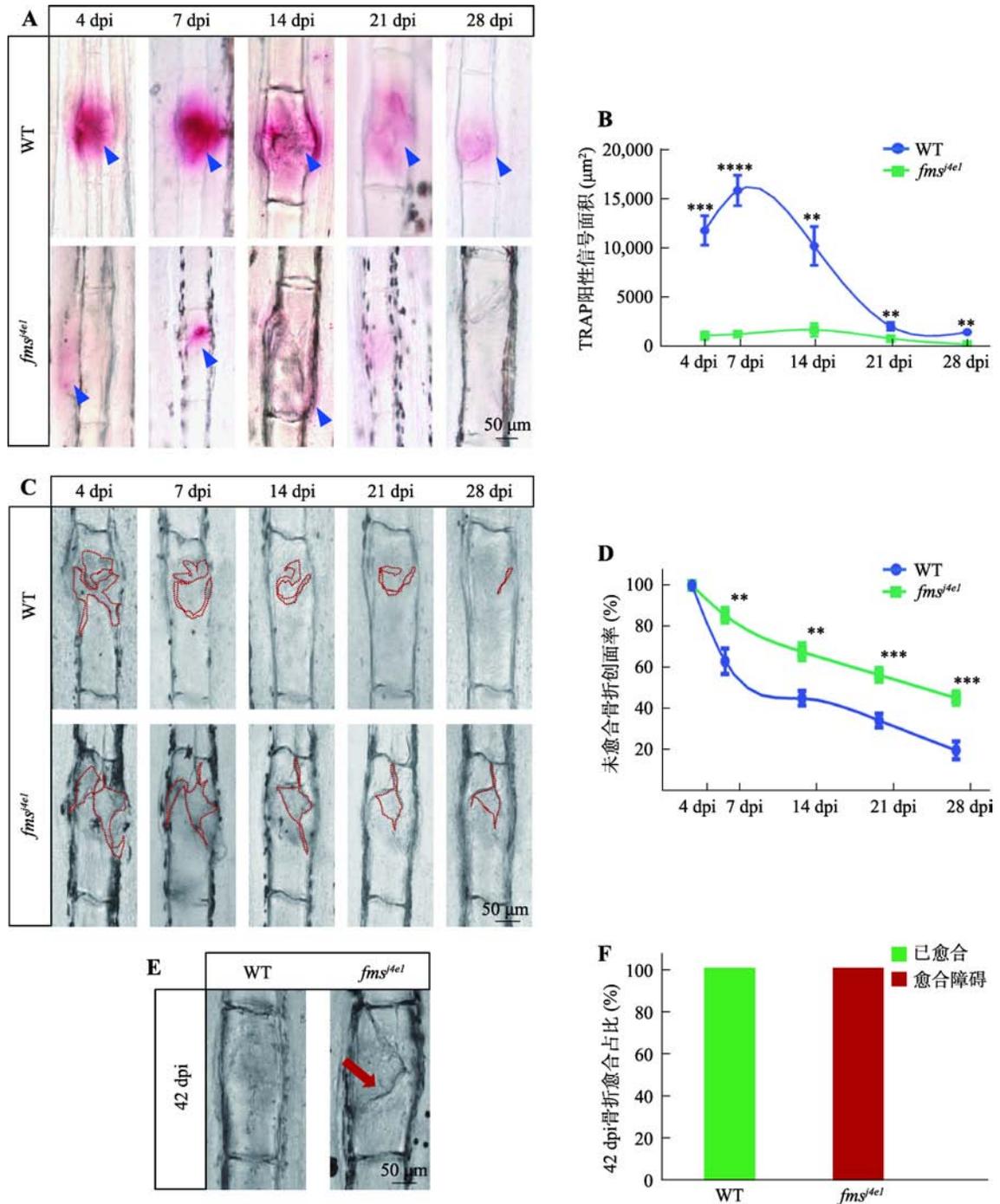


图 1 *fms^{j4el}* 突变体破骨细胞缺陷型骨折模型的建立

Fig. 1 Establishing an osteoclast-deficient fracture model on *fms^{j4el}*

A: WT 与 *fms^{j4el}* 突变体尾鳍骨折后各个时期骨折处 TRAP 染色情况。蓝色三角形指示 TRAP 阳性信号。B: 图 A 中 WT 斑马鱼与 *fms^{j4el}* 突变体尾鳍骨折处 TRAP 阳性信号面积统计图。样本量: 4 dpi 组 WT 和 *fms^{j4el}* 分别为 10、9; 7 dpi 组分别为 15、13; 14 dpi 组分别为 11、14; 21 dpi 组分别为 14、16; 28 dpi 组分别为 10、10。C: WT 斑马鱼与 *fms^{j4el}* 突变体同一骨折处不同时期的愈合情况。D: 图 C 中 WT 斑马鱼与 *fms^{j4el}* 突变体尾鳍骨折后各个时期骨折未愈合创面率(%)统计图。统计方式为 x dpi 时骨折的未愈合创面率%=x dpi 骨折创面面积(图 C 中红色虚线面积)/4 dpi 骨折创面面积; 样本量: WT 为 7 条, *fms^{j4el}* 突变体为 9 条。E: 42 dpi 时 WT 斑马鱼与 *fms^{j4el}* 突变体骨折的尾鳍的愈合情况。红色箭头所指为不愈合情况。F: 图 E 的统计图。WT 和 *fms^{j4el}* 样本量分别为 10、8。图 B、D 中的检验方法为 *t* 检验; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

步筛选方法来获得提高破骨细胞活性的化合物。为了明确适宜的药物筛选条件，通过 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) 检测分析在离体培养不同时长后鳞片上的细胞凋亡情况。结果显示，离体培养 24 h 鳞片上细胞的凋亡

信号较少，并且与 0 h 相比无统计学差异，而鳞片在离体培养 48 h 时凋亡的信号显著增加(图 2, B 和 C)。因此，本研究在培养体系中加入来自 FDA 成药库(含 1280 种 FDA 批准成药)的药物，以 100 $\mu\text{mol/L}$ 的作为药物的初始筛选浓度来培养野生型鳞片，并

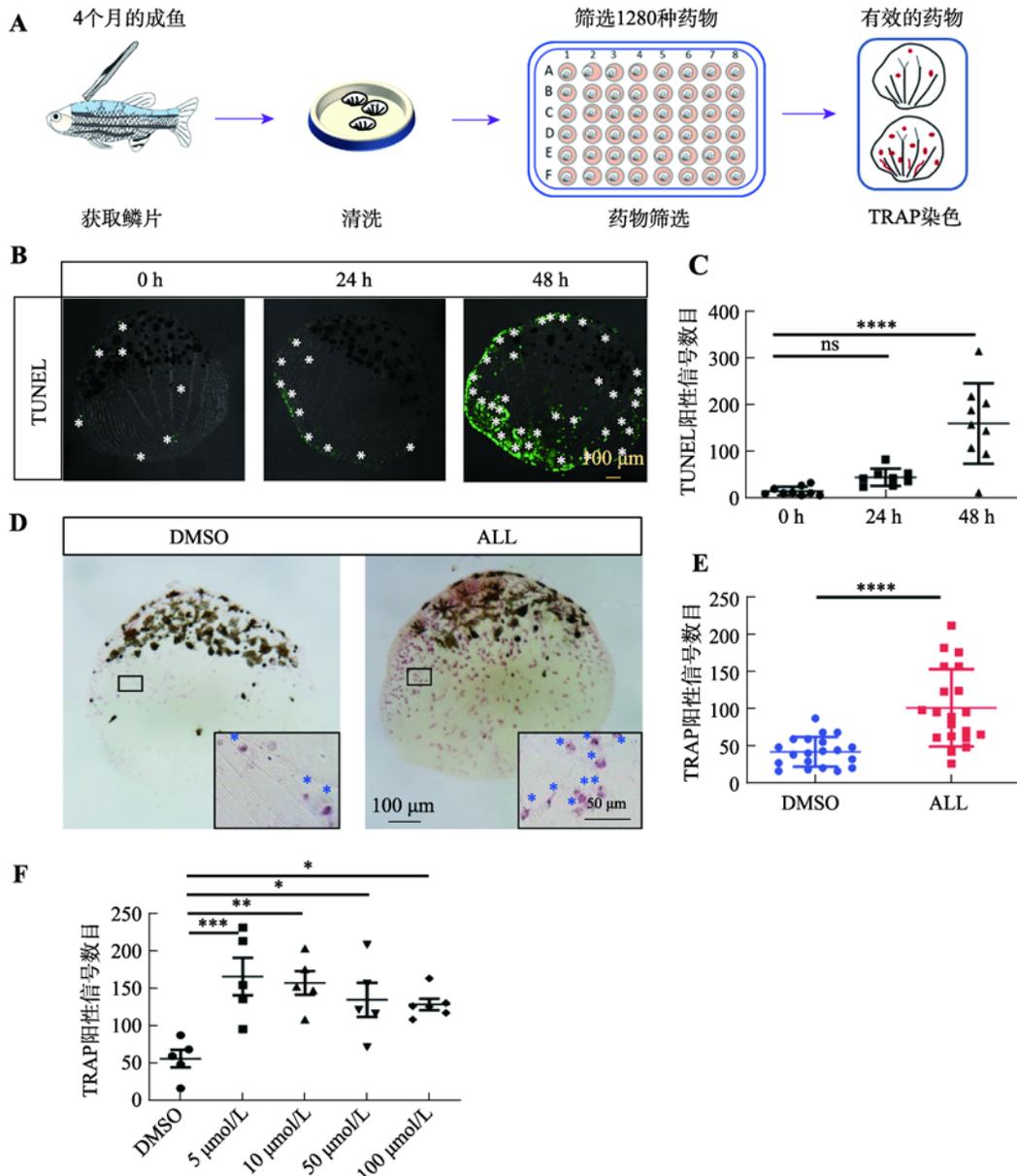


图 2 ALL 可提高离体培养的鳞片上破骨细胞的 TRAP 活性

Fig. 2 ALL could increase TRAP activity of osteoclasts on ex-vivo culturing scales

A: 通过鳞片离体培养体系筛选提高破骨细胞活性药物的模式图。B: 鳞片在离体培养不同时长时 TUNEL 染色的情况。白色星号指示 TUNEL 阳性信号。C: 图 B 中 0 h、24 h 和 48 h 时鳞片上 TUNEL 阳性信号统计图。D: ALL 与 DMSO 离体培养 24 h 后鳞片的 TRAP 染色结果。黑框内为 20 \times 的鳞片局部细节图，蓝色星号指示 TRAP 阳性信号。E: 图 D 中 ALL 组与 DMSO 组鳞片上的 TRAP 阳性信号数目统计图。F: 不同浓度 ALL 与 DMSO 离体培养鳞片 24 h 后，鳞片上 TRAP 阳性信号数目统计图。图 C、F 的检验方式为单因素方差分析；图 E 的检验方式为 *t* 检验；* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，**** $P < 0.0001$ 。

在培养 24 h 后检测鳞片上破骨细胞的 TRAP 活性(图 2 A)。通过初步筛选, 在 FDA 成药库中发现可以显著增加鳞片上破骨细胞 TRAP 活性的 ALL(图 2, D 和 E), 并呈现浓度梯度依赖性(图 2F)。

2.3 ALL 可提高活体 *fms^{j4e1}* 斑马鱼骨折处破骨细胞活性并促进骨折愈合

本研究通过离体培养体系筛选发现 ALL 可以提

高体外破骨细胞活性, 但尚不清楚 ALL 是否能在活体中同样增强破骨细胞缺陷型骨折愈合中破骨细胞的活性。通过设置药物梯度(20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 、60 $\mu\text{mol/L}$ 以及 80 $\mu\text{mol/L}$)对成年斑马鱼进行浸泡给药处理, 发现 ALL 最大不致死剂量为 40 $\mu\text{mol/L}$ (图 3A), 因此本研究使用 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 ALL 和 DMSO 对骨折后的 *fms^{j4e1}* 和 WT 斑马鱼进行浸泡给药, 然后在 7 dpi(骨折愈合中破骨细胞作用的高峰时期)时

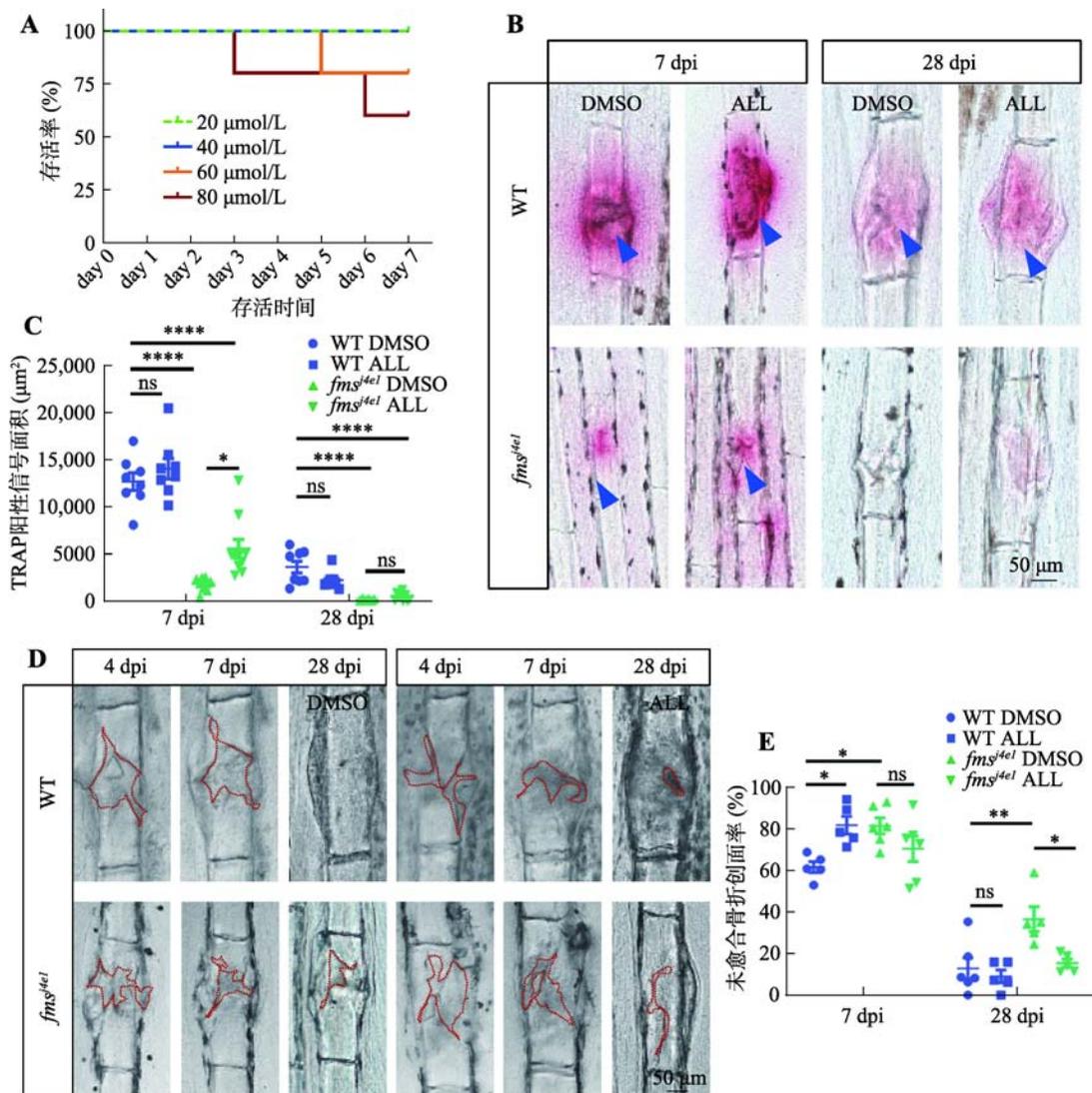


图 3 ALL 对 *fms^{j4e1}* 斑马鱼骨折处破骨细胞活性和骨折愈合的影响

Fig. 3 The effect of allantoin on osteoclast activity and fracture healing in *fms^{j4e1}* mutants

A: 不同浓度 ALL 处理下斑马鱼的生存曲线。用 20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 、60 $\mu\text{mol/L}$ 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 的 ALL 处理 *fms^{j4e1}*, 每组 5 条, 观察药物处理 7 天时间内不同浓度组间斑马鱼存活情况, 并绘制生存曲线。B: WT 和 *fms^{j4e1}* 在 ALL 与 DMSO 处理下不同时期骨折处的 TRAP 染色情况。蓝色三角形指示 TRAP 阳性信号。C: 图 B 中各组 7 dpi 以及 28 dpi 时 TRAP 阳性信号面积统计图。D: WT 斑马鱼和 *fms^{j4e1}* 在 ALL 与 DMSO 处理下不同时期骨折处创面愈合情况。红色虚线标记骨折处创面。E: 图 D 中各组未愈合骨折创面率统计图。图 C、E 的检验方法为单因素方差分析; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

观察骨折处破骨细胞活性的变化。结果显示, fms^{j4e1} 突变体 ALL 处理组尾鳍骨折处的 TRAP 阳性信号与 DMSO 对照组相比有显著增加, 但 WT 斑马鱼骨折处的 TRAP 阳性信号在 ALL 处理组中与对照组中无统计学差异(图 3, B 和 C)。同样对 28 dpi 时各组的斑马鱼尾鳍进行 TRAP 染色, 结果显示, 28 dpi 的 fms^{j4e1} 突变体 ALL 处理组骨折处 TRAP 阳性信号与 DMSO 对照组无明显差异(图 3, B 和 C)。这表明 ALL 能在骨折修复早期提高 fms^{j4e1} 突变体骨折处的破骨细胞活性。

为了进一步研究 ALL 对 fms^{j4e1} 和 WT 斑马鱼骨折修复的影响, 本研究通过测量骨折后创面的未愈合创面率记录了 WT 与 fms^{j4e1} 突变体在 ALL 组的骨折创面愈合情况。结果显示, 7 dpi 时 ALL 处理组中 WT 斑马鱼的骨折未愈合创面率与 DMSO 对照组的相比更大, fms^{j4e1} 突变体的骨折未愈合创面率在 ALL 组与对照组间无明显差异; 而在 28 dpi 时, WT 斑马鱼 ALL 组与 DMSO 组的骨折未愈合创面率无统计学差异, 而在 fms^{j4e1} 突变体中 ALL 组的骨折未愈合创面率较对照组小(图 3, D 和 E)。这提示长期使用 ALL 能够促进 fms^{j4e1} 突变体骨折的愈合。同时尽管 ALL 在短期表现出不利于野生型斑马鱼的骨折愈合, 但其长期使用不影响野生型斑马鱼的骨折创面修复。

2.4 ALL 不影响 fms^{j4e1} 破骨细胞的生成

本研究发现 ALL 可提高 fms^{j4e1} 斑马鱼破骨细胞活性, 为了进一步明确 ALL 对 fms^{j4e1} 斑马鱼破骨细胞数量是否有影响, 本研究在 ALL 给药 7 天后 (7 days post drug, 7 dpd), 通过免疫染色方法检测破骨细胞标记物 L-plastin(Lcp, 标记不成熟以及成熟的破骨细胞)来检测破骨细胞数量^[32, 33]。结果显示, 经 ALL 处理的野生型及 fms^{j4e1} 中尾鳍及鳞片上破骨细胞数量无明显改变(图 4, A~D)。这提示 ALL 可能不影响 fms^{j4e1} 斑马鱼破骨细胞的生成。由于破骨细胞起源于巨噬细胞谱系, 本研究还通过原位杂交检测 ALL 处理组与 DMSO 组中受精后 3.5 天(day post fertilization, dpf)的 WT 与 fms^{j4e1} 胚胎上巨噬细胞标记物 $mfap4$ 的信号数目^[34], 从而评估 ALL 对破骨细胞来源的影响。结果显示, WT 与 fms^{j4e1} 胚胎 ALL 组 $mfap4$ 阳性信号与 DMSO 组间无明显差异

(图 4, E 和 F), 表明 ALL 不影响巨噬细胞的生成。

骨折愈合的骨重塑过程需要成骨细胞和破骨细胞的协同调控。为了分析 ALL 对成骨细胞的影响, 在排除破骨细胞对成骨细胞的间接影响下, 本研究检测了 ALL 处理 6 dpf(此时破骨细胞尚未产生)幼鱼成骨细胞的数量和功能。本研究分别使用成骨细胞标记物 $col101a$ 进行整体原位杂交和茜素红染色^[35], 检测成骨细胞的数量和功能。结果显示, ALL 对成骨细胞的生成和功能没有明显影响(图 4, G 和 H)。

2.5 ALL 促进 fms^{j4e1} 突变体破骨细胞成熟

基于 ALL 在不改变破骨细胞数量的前提下可以提高破骨细胞活性, 本研究猜测 ALL 可能也促进破骨细胞成熟。因此, 本研究利用 Lcp 与 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)共染来区分多核破骨细胞和单核破骨细胞, 并计算 ALL 处理 7 天后 WT 与 fms^{j4e1} 斑马鱼多核破骨细胞比例的变化。结果显示 ALL 处理后, fms^{j4e1} 斑马鱼鳞片及骨折处多核破骨细胞比例显著上升(图 5, A~D), 提示 ALL 可促进破骨细胞成熟。为了进一步明确 ALL 对破骨细胞活性的激活作用机制, 本研究使用 ALL 对 WT 与 fms^{j4e1} 进行浸泡给药 7 天后, 通过 qPCR 检测了影响破骨细胞成熟和功能的关键因素的表达, 如: $rankl$ 、 opg 和 $acp5b$ (TRAP)^[36]。结果显示, 在 ALL 处理的 fms^{j4e1} 突变体的鳞片中, $rankl$ 和 $trap$ 的表达都明显升高, 而破骨细胞生成抑制因子 opg 的表达则下降(图 5 E)。这些结果表明, ALL 可以通过增强 $rankl$ 和抑制 opg 在 fms^{j4e1} 突变体中的表达来促进破骨细胞成熟, 提高破骨细胞活性。

3 讨论

破骨细胞缺陷在临床上常伴有复发性骨折, 且这类骨折在修复过程中多呈愈合困难或者不愈合。但临床上治疗此类骨折, 多采取外科手术治疗, 没有针对性治疗药物。本研究建立了一个 fms 突变体斑马鱼破骨细胞缺陷骨折模型。随后通过离体鳞片培养体系进行药物筛选与活体模型验证, 发现可以激活破骨细胞活性的候选化合物。通过该方法, 本研究筛选发现 ALL 可以促进 fms 突变体的骨折愈合。由于 ALL 是 FDA 批准的具有安全毒理学的药物,

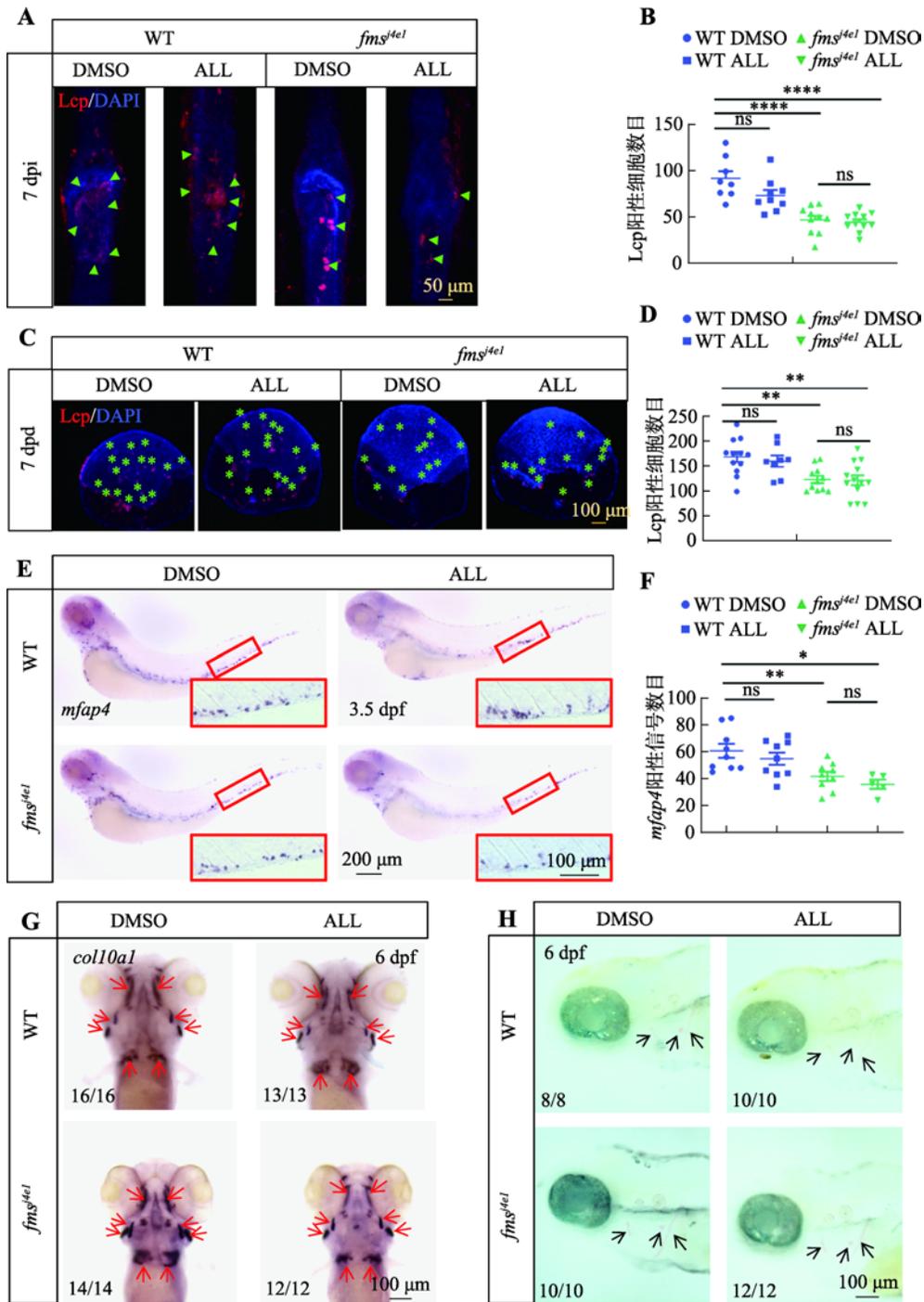


图 4 ALL 不影响 *fms^{j4e1}* 突变体破骨细胞的生成

Fig. 4 ALL does not affect the production of osteoclast in *fms^{j4e1}* mutants

A: WT 和 *fms^{j4e1}* 在 ALL 与 DMSO 处理下 7 dpi 时, 骨折处抗 Lcp 抗体和 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)双染色。绿色三角形所示为 Lcp 阳性细胞。B: 图 A 中各组骨折处 Lcp 阳性细胞数目的统计图。C: WT 和 *fms^{j4e1}* 在药物处理 7 天(7 days post drug, 7 dpd)时鳞片上 Lcp 抗体和 DAPI 双染色结果。绿色星号指示 Lcp 阳性细胞。D: 图 C 中各组 7 dpd 鳞片上 Lcp 阳性细胞数目统计图。E: WT 和 *fms^{j4e1}* 胚胎在 ALL 与 DMSO 处理下, 3.5 dpf 时 *mfap4* 原位杂交结果。红色方框内为 20×尾部造血组织细节图。F: 图 E 中各组 *mfap4* 阳性信号统计图。G: WT 和 *fms^{j4e1}* 胚胎在 ALL 与 DMSO 处理至 6 dpf 时 *col10a1* 整体原位杂交。红色箭头所指为 *col10a1* 阳性信号。H: WT 和 *fms^{j4e1}* 胚胎在 ALL 与 DMSO 处理下 6 dpf 时茜素红染色。黑色箭头所指为茜素红染色阳性信号。图 B、D、F 的检验方法为单因素方差分析; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

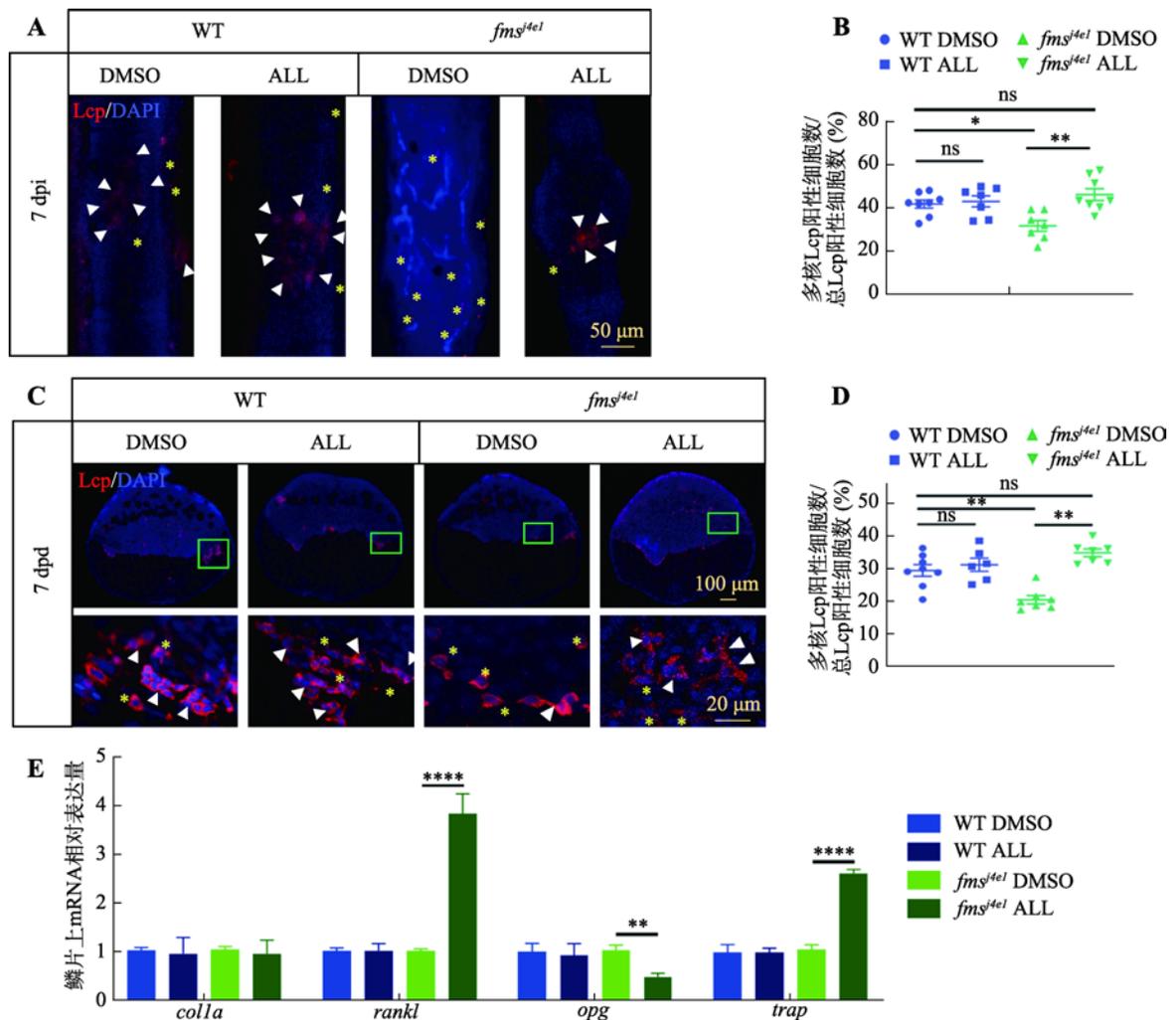


图 5 ALL 促进 *fms^{j4e1}* 突变体破骨细胞的成熟

Fig. 5 ALL promotes the maturation of osteoclast in *fms^{j4e1}* mutants

A: 各组 7 dpi 时骨折处, 抗 Lcp 抗体和 DAPI 双染色结果。白色三角形指示多核 Lcp 阳性细胞, 黄色星号指示单核 Lcp 阳性细胞。
 B: 图 A 中各组中骨折处多核 Lcp 阳性细胞数/总 Lcp 阳性细胞数% 的统计图。C: WT 和 *fms^{j4e1}* 在 ALL 与 DMSO 处理下 7 dpd 时, 鳞片抗 Lcp 抗体和 DAPI 双染色。下方图为 40× 的鳞片局部放大图。D: 图 C 中各组鳞片上多核 Lcp 阳性细胞数/总 Lcp 阳性细胞数% 的统计图。E: WT 斑马鱼和 *fms^{j4e1}* 在 ALL 与 DMSO 处理 7 天时鳞片上的各组间 *colla*、*rankl*、*opg*、*trap* 相对表达量统计图。图 B、D、E 的检验方法为单因素方差分析; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

它对骨折愈合的新作用可以在哺乳动物模型及临床前试验中进一步开发。

临床研究表明, 先天性破骨细胞缺乏导致骨硬化症, 常伴有复发性骨折, 且往往伴有愈合障碍^[37, 38]。破骨细胞活性下降可由破骨细胞形成或功能缺陷引起^[39]。本研究, 建立了 Fms 缺乏(异常成熟破骨细胞)骨折模型。通过分析该模型的骨折愈合过程, 发现破骨细胞在骨折愈合的不同阶段(4 dpi ~ 28 dpi) 都起着重要作用, 这与临床研究是一致的。破骨细

胞形成或成熟的缺陷均可导致早期愈合异常, 最终导致延迟愈合或者骨折不愈合。骨折愈合效果与功能性破骨细胞数量呈正相关。因此, 本研究为重现临床破骨细胞缺乏性骨折不愈合症状提供了一种潜在的动物研究模型。但是, 本研究还存在一定的局限性。例如, 本研究分析骨折愈合过程是通过组织学方法结合 Image J 软件分析进行的。在以往的小鼠研究中 micro-CT 是观测骨折愈合更为有力的方法, 然而普通 micro-CT 的分辨率不足以分析斑马鱼尾鳍

损伤的愈合情况。未来高分辨的 micro-CT 或者荧光染色进行 3D 成像将是更好的选择。

通常情况下, 药物发现需要首选体外细胞筛选, 之后经体内治疗验证来确定其作用^[40, 41]。但是, 由于体外细胞培养脱离了原有的生活环境, 由此获得的药物有效率较低。斑马鱼鳞片作为一种骨组织可以离体培养, 它们不仅含有多种骨细胞成分, 而且容易获得和维持, 是筛选提高破骨细胞活性药物的良好替代方法^[20, 40]。通过这种筛选方法可以提高药物筛选的准确效率。此外, 通过对破骨细胞缺乏型骨折斑马鱼模型的验证, 本研究发现 ALL 能促进 *fms^{4e1}* 突变体破骨细胞成熟缺陷的骨折创面愈合。令人不解的是, ALL 处理可以提高 WT 离体培养鳞片中破骨细胞的 TRAP 活性, 但对 WT 体内骨折部位破骨细胞的 TRAP 活性没有明显增强。这可能是由于两个原因: 一是药物在体外和体内培养组织中的吸收和代谢不同; 另一种是在体内骨折愈合过程中, WT 中破骨细胞已经被招募和激活, 药物治疗并没有增加更多的额外活性。

ALL 是 FDA 批准的药物, 其药理作用和药物代谢途径较为明确。ALL 是嘌呤降解产生的尿酸盐代谢物, 存在于植物和动物中^[23]。在人体中, 由于缺乏功能性尿酸酶, 尿酸也可以通过氧化转化为 ALL, 提示 ALL 是氧化应激的一个指标^[42]。ALL 通过刺激成纤维细胞生长, 作为一种预防瘢痕的产品被广泛应用于临床^[43, 44]。ALL 对骨折修复过程中破骨细胞的作用机制尚不清楚。本研究的数据表明, ALL 通过增加 *rankl* 和抑制 *opg* 表达来增强 *fms^{4e1}* (破骨细胞成熟缺陷突变体) 中破骨细胞的活性。因此, 本研究推测 ALL 通过增加破骨细胞的活性和成熟来促进骨折愈合。然而, ALL 调控 *opg* 和 *rankl* 表达的分子机制还有待进一步研究。

参考文献 (References):

- [1] Kanis JA, Odén A, McCloskey EV, Johansson H, Wahl DA, Cooper C, IOF Working Group on Epidemiology and Quality of Life. A systematic review of hip fracture incidence and probability of fracture worldwide. *Osteoporos Int*, 2012, 23(9): 2239–2256. [DOI]
- [2] Tzioupis C, Giannoudis PV. Prevalence of long-bone non-unions. *Injury*, 2007, 38: S3–S9. [DOI]
- [3] Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, Simpson H, Alt V. Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury*, 2014, 45: S3–S7. [DOI]
- [4] Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, Miclau T, Marcucio RS, Hankenson KD. Cellular biology of fracture healing. *J Orthop Res*, 2019, 37(1): 35–50. [DOI]
- [5] Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: the cellular picture. *Semin Cell Dev Biol*, 2008, 19(5): 459–466. [DOI]
- [6] Takeyama K, Chatani M, Takano Y, Kudo A. *In-vivo* imaging of the fracture healing in medaka revealed two types of osteoclasts before and after the callus formation by osteoblasts. *Dev Biol*, 2014, 394(2): 292–304. [DOI]
- [7] Bhargava A, Vagela M, Lennox CME. "Challenges in the management of fractures in osteopetrosis"! Review of literature and technical tips learned from long-term management of seven patients. *Injury*, 2009, 40(11): 1167–1171. [DOI]
- [8] Strickland JP, Berry DJ. Total joint arthroplasty in patients with osteopetrosis: a report of 5 cases and review of the literature. *J Arthroplasty*, 2005, 20(6): 815–820. [DOI]
- [9] Xiao YL, Palomero J, Grabowska J, Wang LQ, De Rink I, Van Helvert L, Borst J. Macrophages and osteoclasts stem from a bipotent progenitor downstream of a macrophage/osteoclast/dendritic cell progenitor. *Blood Adv*, 2017, 1(23): 1993–2006. [DOI]
- [10] Halasy-Nagy J, Hofstetter W. Expression of colony-stimulating factor-1 *in vivo* during the formation of osteoclasts. *J Bone Miner Res*, 1998, 13(8): 1267–1274. [DOI]
- [11] Kim JH, Kim N. Signaling pathways in osteoclast differentiation. *Chonnam Med J*, 2016, 52(1): 12–17. [DOI]
- [12] Mun SH, Park PSU, Park-Min KH. The M-CSF receptor in osteoclasts and beyond. *Exp Mol Med*, 2020, 52(8): 1239–1254. [DOI]
- [13] Kim HH, Lee DE, Shin JN, Lee YS, Jeon YM, Chung CH, Ni J, Kwon BS, Lee ZH. Receptor activator of NF-kappaB recruits multiple TRAF family adaptors and activates c-Jun N-terminal kinase. *FEBS Lett*, 1999, 443(3): 297–302. [DOI]
- [14] Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst*

- Biol Med*, 2010, 2(6): 640–653. [DOI]
- [15] Dai XM, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, Sylvestre V, Stanley ER. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood*, 2002, 99(1): 111–120. [DOI]
- [16] Li J, Chen K, Zhu LY, Pollard JW. Conditional deletion of the colony stimulating factor-1 receptor (c-fms proto-oncogene) in mice. *Genesis*, 2006, 44(7): 328–335. [DOI]
- [17] Liu W, Di QQ, Li KL, Li J, Ma N, Huang ZB, Chen JH, Zhang S, Zhang WQ, Zhang YY. The synergistic role of Pu.1 and Fms in zebrafish osteoclast-reducing osteopetrosis and possible therapeutic strategies. *J Genet Genomics*, 2020, 47(9): 535–546. [DOI]
- [18] Guo L, Bertola DR, Takanohashi A, Saito A, Segawa Y, Yokota T, Ishibashi S, Nishida Y, Yamamoto GL, Da Silva Franco JF, Honjo RS, Kim CA, Musso CM, Timmons M, Pizzino A, Taft RJ, Lajoie B, Knight MA, Fischbeck KH, Singleton AB, Ferreira CR, Wang Z, Yan L, Garbern JY, Simsek-Kiper PO, Ohashi H, Robey PG, Boyde A, Matsumoto N, Miyake N, Spranger J, Schiffmann R, Vanderver A, Nishimura G, Dos Santos Passos-Bueno MR, Simons C, Ishikawa K, Ikegawa S. Bi-allelic CSF1R mutations cause skeletal dysplasia of dysosteosclerosis-pyle disease spectrum and degenerative encephalopathy with brain malformation. *Am J Hum Genet*, 2019, 104(5): 925–935. [DOI]
- [19] Witten PE, Harris MP, Huysseune A, Winkler C. Small teleost fish provide new insights into human skeletal diseases. *Methods Cell Biol*, 2017, 138: 321–346. [DOI]
- [20] Bergen DJM, Kague E, Hammond CL. Zebrafish as an emerging model for osteoporosis: a primary testing platform for screening new osteo-active compounds. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 6. [DOI]
- [21] Sousa S, Valerio F, Jacinto A. A new zebrafish bone crush injury model. *Biol Open*, 2012, 1(9): 915–921. [DOI]
- [22] Tomecka MJ, Ethiraj LP, Sánchez LM, Roehl HH, Carney TJ. Clinical pathologies of bone fracture modelled in zebrafish. *Dis Model Mech*, 2019, 12(9): dmm037630. [DOI]
- [23] Werner AK, Witte CP. The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism. *Trends Plant Sci*, 2011, 16(7): 381–387. [DOI]
- [24] Araújo LU, Grabe-Guimarães A, Mosqueira VCF, Carneiro CM, Silva-Barcellos NM. Profile of wound healing process induced by allantoin. *Acta Cir Bras*, 2010, 25(5): 460–466. [DOI]
- [25] Parichy DM, Ransom DG, Paw B, Zon LI, Johnson SL. An orthologue of the kit-related gene *fms* is required for development of neural crest-derived xanthophores and a subpopulation of adult melanocytes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 2000, 127(14): 3031–3044. [DOI]
- [26] Westerfield M. The zebrafish book : a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Eugene: University of Oregon press, 1995. [DOI]
- [27] Shimizu T, Fujita N, Tsuji-Tamura K, Kitagawa Y, Fujisawa T, Tamura M, Sato M. Osteocytes as main responders to low-intensity pulsed ultrasound treatment during fracture healing. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 10298. [DOI]
- [28] Pang P, Shimo T, Takada H, Matsumoto K, Yoshioka N, Ibaragi S, Sasaki A. Expression pattern of sonic hedgehog signaling and calcitonin gene-related peptide in the socket healing process after tooth extraction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 467(1): 21–26. [DOI]
- [29] Moens C. Whole mount RNA *in situ* hybridization on zebrafish embryos: probe synthesis. *CSH Protoc*, 2008, 2008: pdb.prot5036. [DOI]
- [30] Jin H, Sood R, Xu J, Zhen FH, English MA, Liu PP, Wen ZL. Definitive hematopoietic stem/progenitor cells manifest distinct differentiation output in the zebrafish VDA and PBI. *Development*, 2009, 136(4): 647–654. [DOI]
- [31] Pasqualetti S, Banfi G, Mariotti M. Osteoblast and osteoclast behavior in zebrafish cultured scales. *Cell Tissue Res*, 2012, 350(1): 69–75. [DOI]
- [32] Babb SG, Matsudaira P, Sato M, Correia I, Lim SS. Fimbrin in podosomes of monocyte-derived osteoclasts. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1997, 37(4): 308–325. [DOI]
- [33] Morley SC. The actin-bundling protein L-plastin: a critical regulator of immune cell function. *Int J Cell Biol*, 2012, 2012: 935173. [DOI]
- [34] Zakrzewska A, Cui C, Stockhammer OW, Benard EL, Spaink HP, Meijer AH. Macrophage-specific gene functions in Spi1-directed innate immunity. *Blood*, 2010, 116(3): e1–e11. [DOI]
- [35] Li N, Felber K, Elks P, Croucher P, Roehl HH. Tracking gene expression during zebrafish osteoblast differentiation. *Dev Dyn*, 2009, 238(2): 459–466. [DOI]
- [36] Silva I, Branco JC. Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta Reumatol Port*, 2011, 36(3): 209–218. [DOI]
- [37] Dahl N, Holmgren G, Holmberg S, Ersmark H. Fracture patterns in malignant osteopetrosis (Albers-Schönberg

- disease). *Arch Orthop Trauma Surg*, 1992, 111(2): 121–123. [DOI]
- [38] De Palma L, Tulli A, Maccauro G, Sabetta SP, Del Torto M. Fracture callus in osteopetrosis. *Clin Orthop Relat Res*, 1994, (308): 85–89. [DOI]
- [39] Sobacchi C, Schulz A, Coxon FP, Villa A, Helfrich MH. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nat Rev Endocrinol*, 2013, 9(9): 522–536. [DOI]
- [40] Szabo M, Akusjärvi SS, Saxena A, Liu JP, Chandrasekar G, Kitambi SS. Cell and small animal models for phenotypic drug discovery. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11: 1957–1967. [DOI]
- [41] Zhang T, Han WQ, Zhao KX, Yang WL, Lu XY, Jia YW, Qin A, Qian Y. Psoralen accelerates bone fracture healing by activating both osteoclasts and osteoblasts. *FASEB J*, 2019, 33(4): 5399–5410. [DOI]
- [42] Gruber J, Tang SY, Jenner AM, Mudway I, Blomberg A, Behndig A, Kasiman K, Lee CYJ, Seet RCS, Zhang WX, Chen C, Kelly FJ, Halliwell B. Allantoin in human plasma, serum, and nasal-lining fluids as a biomarker of oxidative stress: avoiding artifacts and establishing real in vivo concentrations. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(8): 1767–1776. [DOI]
- [43] Araújo LU, Reis PG, Barbosa LCO, Saúde-Guimarães DA, Grabe-Guimarães A, Mosqueira VCF, Carneiro CM, Silva-Barcellos NM. *In vivo* wound healing effects of *Symphytum officinale* L. leaves extract in different topical formulations. *Pharmazie*, 2012, 67(4): 355–360. [DOI]
- [44] Florentino IF, Silva DPB, Galdino PM, Lino RC, Martins JLR, Silva DM, De Paula JR, Tresvenzol LMF, Costa EA. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Memora nodosa* and allantoin in mice. *J Ethnopharmacol*, 2016, 186: 298–304. [DOI]

(责任编辑: 林古法)