

# 妥布霉素激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路上调 ALP 和 RUNX2 蛋白表达促进骨折愈合的实验研究

崔宏刚

(郑州市第七人民医院骨三科, 河南 郑州 450000 E-mail: chg201909@163.com)

**【摘要】** 目的:探究妥布霉素(tobramycin, TOB)对大鼠股骨骨折愈合的影响。方法:选取 32 只 4~6 周龄清洁级雄性 SD 大鼠,体重 200~220 g,分为假手术组(A组)、骨折组(B组)、骨折+TOB组(C组)和骨折+TOB+IWR-1组(D组),每组 8 只。B、C、D 组大鼠经闭合性股骨骨折造模法建立骨折模型;A 组为假手术组,不做处理;D 组大鼠于造模前 1 d 腹腔注射 100  $\mu$ l (8  $\mu$ M) Wnt 通路抑制剂(IWR-1-endo, IWR-1)。造模 1 d 后, C、D 两组大鼠腹腔注射 100  $\mu$ l (100  $\mu$ M) TOB, 每天 1 次,共 7 d。造模 7 周后,拍摄 X 线片观察 B、C、D 组大鼠的骨折愈合情况;Western-blotting 法检测 4 组大鼠碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP), Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2) 和 Wnt 信号通路中  $\beta$ -catenin 蛋白的表达。结果:X 线片结果显示, C 组与造模初期相比,骨折线消失,骨痂形成和骨折愈合良好;B、D 两组仍可见少量骨折线,骨痂形成和骨折愈合不良。Western-blotting 结果显示, B、C、D 组的 ALP、RUNX2、 $\beta$ -catenin 蛋白表达均高于 A 组 ( $P < 0.05$ ); C 组 ALP、RUNX2、 $\beta$ -catenin 蛋白表达水平较 B、D 两组升高 ( $P < 0.05$ );应用通路抑制剂 IWR-1 后, D 组 ALP、RUNX2、 $\beta$ -catenin 蛋白与 B 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论:妥布霉素可以通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,上调 ALP、RUNX2 蛋白的表达,促进成骨细胞的分化,进而促进骨折愈合。

**【关键词】** 妥布霉素; 成骨; 骨折愈合; Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路

中图分类号:R683

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2021.09.015

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



**Tobramycin promotes fracture healing by upregulating expressions of ALP and RUNX2 proteins through activating Wnt/ $\beta$ -catenin pathway** CUI Hong-gang. The Third Department of Orthopaedics, the 7th People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000, Henan, China

**ABSTRACT Objective:** To explore effect of tobramycin (TOB) on healing of femoral fractures in rats. Methods: Totally 32 male sprague-dawley (SD) rats were selected and randomly divided into sham group (group A), fracture group (group B), fracture with TOB group (group C) and fracture + TOB + IWR-1 group (group D), 8 rats in each group. Close femoral fracture model in rats were established in group B, C and D, group A was sham operation without otherwise process. Group D was intraperitoneal injected 100  $\mu$ l (8  $\mu$ M) of Wnt pathway inhibitor IWR-1-endo (IWR-1) before molding at 1 day. At 1 day after molding, 100  $\mu$ l (100  $\mu$ M) of TOB was intraperitoneally injected into group C and D at once a day for 7 days. At 7 weeks after modling, fracture healing of group B, C and D were observed by X-ray, Western-blotting was applied to detect alkaline phosphatase (ALP) and Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and  $\beta$ -catenin of Wnt passway. **Results:** X-ray results showed fracture line disappeared, callus formation and fracture healing well in group C compared with begning of molding; while a little fracture line, callus formation and fracture malunion in group B and d could be seen. Western-blotting results showed ALP, RUNX2 and expression of  $\beta$ -catenin in group B, C and D were higher than that of group A ( $P < 0.05$ ), while ALP, RUNX2 and  $\beta$ -catenin expression in group C was significantly higher than that of group B and D ( $P < 0.05$ ). After administration of pathway inhibitor IWR-1, there were no significance difference in ALP, RUNX2 and  $\beta$ -catenin protein expression between group D and group B ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Tobramycin could promote osteoblast differentiation and fracture healing by stimulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, up regulating expression of ALP and RUNX2.

**KEYWORDS** Tobramycin; Osteogenesis; Fracture healing; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

骨折愈合不良是骨折后最常见的并发症,严重影响患者的生活质量<sup>[1]</sup>。探究促进骨折愈合的治疗策略及相关机制具有重要意义。妥布霉素临床主要用于治疗革兰阴性杆菌所致的新生儿脓毒血症、败

血症、中枢神经系统感染、肺部感染等疾病。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)是骨折修复过程中的重要生化指标,其高表达是成骨细胞分化的特异性标志,是评价骨形成的常用指标<sup>[2]</sup>。Runt 相关转录

因子 2(Runt-related transcription factor 2, RUNX2)是骨髓间充质干细胞成骨分化所必需的关键因子<sup>[3]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在骨折愈合中起着重要作用<sup>[4-5]</sup>,其中  $\beta$ -catenin 是该通路中最重要的调节分子,能与核内转录因子(lymphoid enhancer factor/T-cell factor, TCF/LEF)结合,改变 DNA 结构,启动下游 RUNX2 等靶基因的转录,促进成骨细胞分化增殖。为了提高骨折的治疗效果,许多药物被研究用来促进骨折愈合,其中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关药物已受到广泛关注<sup>[5]</sup>。本研究拟建立大鼠骨折模型,探究妥布霉素对大鼠骨折愈合的影响及其可能的作用机制,以期为临床骨折治疗及相关基础研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂与仪器

戊巴比妥钠(上海先锋药业有限公司,批号:S100724);妥布霉素(江苏鹏鹞药业有限公司,国药准字:H32024870);Wnt 通路抑制剂 IWR-1 (Sell-eck,美国);裂解缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司,中国);BCA 蛋白检测试剂盒(Pierce,美国);GAPDH 抗体(Cell Signaling Technology,美国); $\beta$ -catenin, RUNX2, ALP 抗体[(艾博抗(上海)贸易有限公司,中国)];X 射线机(LX-20A 型,天津邦盛医疗设备有限公司,中国);4 °C 培养箱(FYL-YS-128 型,北京福意电器有限公司,中国)。

### 1.2 实验动物

取 4~6 周龄清洁级雄性 SD 大鼠 32 只,体重 200~220 g,购于上海 SLAC 实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2017-0005。在室温 20~22 °C,相对湿度 50%~60%,光周期 12 h 的环境下饲养,自由饮食饮水。养殖环境定期消毒,保持清洁。本实验项目已通过郑州市第七人民医院伦理委员会批准。

### 1.3 造模方法

参考 Cheung 等<sup>[6]</sup>方法构建大鼠股骨骨折模型。适应性喂养 1 周后,依据大鼠体重,给予 30 mg/kg, 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,麻醉成功后将大鼠置于仰卧位,右后肢固定于力学实验机底座,调整钝刀冲击参数为 15 cm/s,撞击股骨近端,X 线证实造模成功与否。

### 1.4 分组与干预措施

按照随机数字表法将 SD 大鼠分为 4 组:假手术组(A 组)、骨折组(B 组)、骨折+TOB 组(C 组)和骨折+TOB+IWR-1 组(D 组),每组 8 只。A 组为假手术组,不予处理;B、C、D 组大鼠均接受骨折造模;其中,D 组大鼠于造模前 1 d 腹腔注射 100  $\mu$ l (8  $\mu$ M) Wnt 通路抑制剂 IWR-1;造模 24 h 后,C、D

组大鼠开始腹腔注射 100  $\mu$ l (100  $\mu$ M) TOB,每天 1 次,共 7 d。

### 1.5 观察项目与方法

**1.5.1 X 线片检查** 造模 1 d 后,拍摄大鼠右侧股骨 X 线片,证实骨折模型的成功建立。造模 7 周时处死大鼠,取右侧股骨标本,保留全长股骨,利用 X 射线机进行摄片(100 mA, 50 kV, 投影距离 90 cm)。观察 B、C、D 组大鼠骨折愈合及骨痂形成情况。

**1.5.2 ALP、RUNX2 及  $\beta$ -catenin 表达检测** 造模 7 周时,每组取 4 只大鼠,取股骨骨痂组织,粉碎,均匀混合,加入裂解液进行蛋白提取。使用二辛可宁酸(bicinchoninic acid)法进行蛋白定量,配制上样缓冲液,电泳分离蛋白。随后将蛋白转移到硝酸纤维膜上,用 10%脱脂牛奶封闭 1 h,加 ALP (取样比例为 1:1 000)、RUNX2 (取样比例为 1:1 000)、 $\beta$ -catenin (取样比例为 1:1 500),4 °C 培养箱过夜。隔夜取出滴加二抗,室温下孵育 1 h。洗涤缓冲液洗涤后用显影液显影,曝光。采用 Western-blotting 法测定其灰度值,内参为 GAPDH。

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS 19.0 进行统计学分析。定量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 影像学结果

造模 1 d 后,X 线片证实骨折造模成功。7 周时,拍摄右侧股骨正位 X 线片,结果显示,B、C、D 组股骨骨折排列良好,无明显骨折移位。C 组愈伤组织直径较大,两侧愈伤组织密度较高。B、D 组有骨痂形成,但仍可见骨折线。C 组骨折愈合较好,骨痂形成较多,较 B、D 两组有显著差异。见图 1-2。

### 2.3 Western-blotting 结果

术后 7 周 Western-blotting 结果显示,B、C、D 组大鼠的 ALP、RUNX2、 $\beta$ -catenin 蛋白表达均高于 A 组( $P<0.05$ );C 组 ALP、RUNX2、 $\beta$ -catenin 蛋白表达水平高于 B、D 组( $P<0.05$ );D 组 ALP、RUNX2、 $\beta$ -catenin 蛋白的表达与 B 组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图 3,表 1。

## 3 讨论

### 3.1 妥布霉素上调 ALP、RUNX2 蛋白表达促进骨折愈合

妥布霉素是一种具有高抗菌敏感性的抗生素,研究表明<sup>[7]</sup>,使用妥布霉素或者联合其他抗生素一起使用可以有效预防骨折术后的感染。然而,作为一种抗菌药物,妥布霉素能否单独应用以促进骨折愈



图 1 骨折造模初期时 X 线表现  
Fig.1 X-ray manifestation of fracture in rats at initial stage

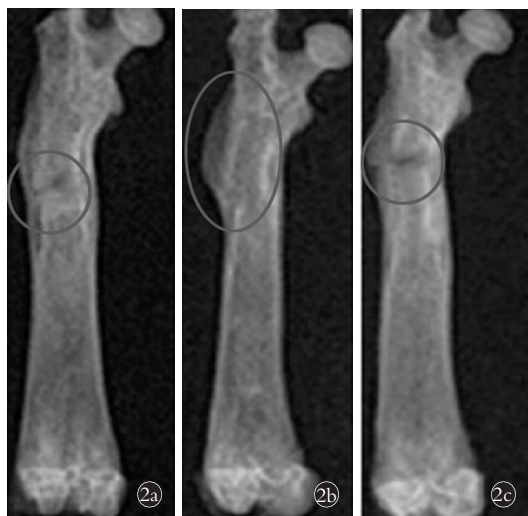


图 2 骨折 7 周时各组 X 线表现 2a. B 组 2b. C 组 2c. D 组  
Fig.2 X-ray manifestation of each group at 7 weeks after fracture  
2a. Group B 2b. Group C 2c. Group D

表 1 各组大鼠骨痂组织中蛋白的相对表达水平  
Tab.1 Relative expression of protein in callus tissue among each group

| 组别  | 鼠数 | ALP                         | RUNX2                       | β-catenin                   |
|-----|----|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| A 组 | 4  | 1.00±0.20                   | 1.00±0.10                   | 1.03±0.16                   |
| B 组 | 4  | 3.11±0.32 <sup>a1</sup>     | 2.11±0.18 <sup>a2</sup>     | 1.80±0.14 <sup>a3</sup>     |
| C 组 | 4  | 4.13±0.44 <sup>a4b1</sup>   | 3.22±0.18 <sup>a5b2</sup>   | 2.51±0.33 <sup>a6b3</sup>   |
| D 组 | 4  | 3.39±0.17 <sup>a7b4c1</sup> | 2.30±0.22 <sup>a8b5c2</sup> | 1.93±0.28 <sup>a9b6c3</sup> |
| F 值 |    | 79.03                       | 107.8                       | 25.52                       |
| P 值 |    | 0.00                        | 0.00                        | 0.00                        |

注: A 组:假手术组; B 组:骨折组; C 组:骨折+TOB 组; D 组:骨折+TOB+IWR-1 组。与 A 组比较, <sup>a1</sup>t=9.88, <sup>a2</sup>t=8.95, <sup>a3</sup>t=4.52, <sup>a4</sup>t=14.66, <sup>a5</sup>t=17.89, <sup>a6</sup>t=8.68, <sup>a7</sup>t=11.19, <sup>a8</sup>t=10.48, <sup>a9</sup>t=5.28, P<0.05; 与 B 组比较, <sup>b1</sup>t=4.78, <sup>b2</sup>t=8.95, <sup>b3</sup>t=4.17, P<0.05; <sup>b4</sup>t=1.31, <sup>b5</sup>t=1.53, <sup>b6</sup>t=0.76, P>0.05; 与 C 组比较, <sup>c1</sup>t=3.47, <sup>c2</sup>t=7.41, <sup>c3</sup>t=3.40, P<0.05

Note: Group A: sham group; group B: fracture group; group C: fracture + TOB group; group D: fracture + TOB + IWR-1 group. Compared with group A, <sup>a1</sup>t=9.88, <sup>a2</sup>t=8.95, <sup>a3</sup>t=4.52, <sup>a4</sup>t=14.66, <sup>a5</sup>t=17.89, <sup>a6</sup>t=8.68, <sup>a7</sup>t=11.19, <sup>a8</sup>t=10.48, <sup>a9</sup>t=5.28, P<0.05; compared with group B, <sup>b1</sup>t=4.78, <sup>b2</sup>t=8.95, <sup>b3</sup>t=4.17, P<0.05; <sup>b4</sup>t=1.31, <sup>b5</sup>t=1.53, <sup>b6</sup>t=0.76, P>0.05; compared with group C, <sup>c1</sup>t=3.47, <sup>c2</sup>t=7.41, <sup>c3</sup>t=3.40, P<0.05

合,国内外研究尚少。本研究单独使用妥布霉素,对股骨骨折大鼠进行治疗,通过 X 线片发现,造模 7 周时, C 组与造模初期相比骨折线明显消失,骨痂形成和骨折愈合良好,愈伤组织直径较大,两侧愈伤组织密度较高,其骨折愈合情况明显优于 B、D 组,提示妥布霉素对大鼠骨折后的愈合具有明显的促进作用,这可能是由于妥布霉素促进了成骨细胞的分化。

为了验证这一猜想,本研究进一步检测了成骨分化的特异性标记 ALP、RUNX2 蛋白的表达。通过比较 B、C 两组的 Western-blotting 结果发现,妥布霉素可以明显提高 ALP、RUNX2 蛋白的表达,提示妥布霉素促进骨折修复可能是由于其对 ALP、RUNX2 表达的上调,继而促进成骨细胞的分化。

Yu 等<sup>[8]</sup>的研究结果也表明妥布霉素在体外具有比对照组更好的骨再生效果。另一项体内研究<sup>[9]</sup>亦发现,使用妥布霉素粉末有利于骨融合。妥布霉素和万古霉素浸渍材料植入兔胫骨模型的研究发现,在成骨评分方面,妥布霉素比万古霉素有更好的成骨效果<sup>[10]</sup>。因此,本研究认为应用妥布霉素能够促进成骨细胞的分化,进而促进骨折的愈合,在骨科手术中应用妥布霉素或可促进患者康复,降低感染和骨不连的发生率,减少住院时间。

### 3.2 Wnt/β-catenin 信号通路对 ALP、RUNX2 蛋白表达的调控

研究表明<sup>[5,11-12]</sup>,成骨细胞对特定基质的利用受

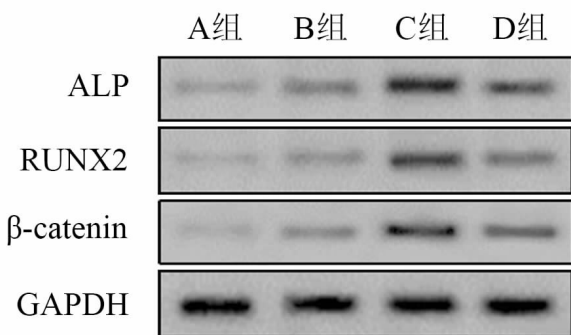


图 3 各组 ALP、RUNX2、β-catenin 蛋白免疫印迹结果。A 组,假手术组; B 组,骨折组; C 组,骨折+TOB 组; D 组,骨折+TOB+IWR-1 组  
Fig.3 Western-blotting results of ALP, RUNX2 and β-catenin in each group group A, sham group; group B, fracture group; group C: fracture + TOB group; group D, fracture + TOB + IWR-1 group

到关键激素信号的控制,其中最重要的是 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,其在骨折愈合的不同阶段均发挥着重要作用,包括软骨细胞增殖分化、软骨内成骨、骨骺吸收、成形和重建。本研究结果发现,骨折后大鼠的  $\beta$ -catenin 蛋白表达明显上调。众所周知, $\beta$ -catenin 蛋白的积累是 Wnt 信号通路激活的关键触发因子<sup>[13]</sup>,以上提示骨折可以激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路。而妥布霉素干预后,大鼠的  $\beta$ -catenin 蛋白表达水平进一步升高,这表明妥布霉素处理可以增强骨折后 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活,并且该通路激活时其相应组别大鼠的骨折愈合情况明显优于对照组,提示妥布霉素促进骨折愈合是由 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路介导的。

此外,本研究还发现当  $\beta$ -catenin 蛋白进一步上调时,ALP、RUNX2 蛋白的表达也随之升高。因此,为进一步建立骨折后应用妥布霉素与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路激活以及 ALP、RUNX2 蛋白表达之间的潜在因果关系,给予 Wnt 通路的选择性抑制剂 IWR-1,结果显示,在骨折手术前 24 h 用 100  $\mu$ l (8  $\mu$ M) IWR-1 处理,能有效抑制骨折术后 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活,而与是否应用妥布霉素无关。更重要的是,随着信号通路的终止激活,成骨分化特异性标记 ALP、RUNX2 蛋白的表达均显著减弱。以上结果表明妥布霉素可通过促进 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路介导的成骨细胞分化进而促进骨折愈合。

综上所述,妥布霉素可能通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路上调 ALP、RUNX2 表达,促进成骨细胞分化,并最终促进骨折愈合。未来将从细胞水平深入研究,进一步阐明妥布霉素影响骨折愈合的机制,为临床骨折的治疗提供新的干预靶点及思路。

#### 参考文献

- [1] Lv H, Yin P, Long A, et al. Clinical characteristics and risk factors of postoperative pneumonia after hip fracture surgery: a prospective cohort study[J]. *Osteoporos Int*, 2016, 27(10): 3001-3009.
- [2] 向兴彤, 豆贲, 韩世峰, 等. 补阳还五汤对老年 Colles 骨折手法复位小夹板外固定后患者早期骨痂 X 线评分及血清碱性磷酸酶水平的影响[J]. *中国骨伤*, 2020, 33(3): 241-246.  
XIANG XT, DOU B, HAN SF, et al. Effect of Buyang Huanwu decoction on X-ray evaluation of early callus and level of serum alkaline phosphatase in elderly patients with Colles fracture after manual reduction and splint external fixation[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2020, 33(3): 241-246. Chinese with abstract in English.
- [3] Zhang GL, Liu WJ, Wang RL, et al. The role of tantalum nanoparticles in bone regeneration involves the BMP2/Smad4/Runx2 signaling pathway[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 3391.
- [4] Gu H, Li Z, Lv XF, et al. LncRNA KCNQ10T1 delayed fracture healing through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(11): 4575-4583.
- [5] Teng JW, Ji PF, Zhao ZG. MiR-214-3p inhibits  $\beta$ -catenin signaling pathway leading to delayed fracture healing[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(1): 17-24.
- [6] Cheung K, Kaluarachchi K, Andrew G, et al. An externally fixed femoral fracture model for mice[J]. *J Orthop Res*, 2003, 21(4): 685-690.
- [7] 支乐, 李家玲. 妥布霉素不同途径给药对骨折内固定术后感染患者的疗效评价[J]. *抗感染药学*, 2015, 12(6): 853-855.  
ZHI L, LI JL. Evaluation of the efficacy of different administration of tobramycin in patients with infection after internal fixation of fracture[J]. *Kang Gan Ran Yao Xue*, 2015, 12(6): 853-855. Chinese.
- [8] Yu LJ, Fei Q, Lin JS, et al. The osteogenic effect of local delivery of vancomycin and T obramycin on bone marrow stromal cells[J]. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 2083-2091.
- [9] Ishida W, Perdomo-Pantoja A, Elder BD, et al. Effects of intraoperative intrawound antibiotic administration on spinal fusion: a comparison of vancomycin and tobramycin in a rat model[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2019, 101(19): 1741-1749.
- [10] Pffringer D, Harrasser N, Muhlhofer H, et al. Osteoinduction and-conduction through absorbable bone substitute materials based on calcium sulfate: in vivo biological behavior in a rabbit model[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2018, 29(17): 1-14.
- [11] Zhou J, Liu HX, Li SH, et al. Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived exosomes on fracture healing in rats through the Wnt signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(11): 4954-4960.
- [12] Yao CJ, LYU Y, Zhang CJ, et al. MicroRNA-185 inhibits the growth and proliferation of osteoblasts in fracture healing by targeting PTH gene through down-regulating Wnt/ $\beta$ -catenin axis: In an animal experiment[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 501(1): 55-63.
- [13] Jin HT, Wang BL, Li J, et al. Anti-DKK1 antibody promotes bone fracture healing through activation of  $\beta$ -catenin signaling[J]. *Bone*, 2015, 71: 63-75.

(收稿日期: 2020-11-06 本文编辑: 李宜)