

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.10.014

Jmjd3 和 *Ezh2* 拮抗调节小鼠骨折愈合*

王新力^{1#} 王钰莹^{3#} 赵雄¹ 王冠杰² 汪钰² 张鑫² 张冉² 张之岩²
杨博² 马福浩² 许宏业² 武晓慧³ 雷伟^{1Δ} 张丰^{3Δ}

(1 第四军医大学西京医院骨科 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学学员旅 陕西 西安 710032;

3 第四军医大学西京医院病理科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨 *Jmjd3* 和 *Ezh2* 在小鼠骨折愈合过程中的作用。**方法:**以软骨细胞条件性基因敲除 8-10 周龄小鼠为研究对象,按基因型随机分为 6 组,每组 5 只:其中实验组基因型为 *Jmjd3^{fl/fl}/Col2a1-Cre^{ERT2}*, *Ezh2^{fl/fl}/Col2a1-Cre^{ERT2}* 或 *Jmjd3^{fl/fl}/Ezh2^{fl/fl}/Col2a1-Cre^{ERT2}*;对照组基因型为 *Jmjd3^{fl/fl}*, *Ezh2^{fl/fl}* 或 *Jmjd3^{fl/fl}/Ezh2^{fl/fl}*。建立骨髓腔中插入固定针的稳定性胫骨骨折模型,于骨折术后 3 天、5 天和 7 天腹腔注射 Tamoxifen 3 mg/次/天。各组于术后 3W 处死,并于骨折部位取材行 X 线片及组织学检查。**结果:**通过连续的 X 线影像学及 HE 组织切片观察,骨折术后 3 周是判断小鼠骨折愈合情况的最佳时间点。X 线片发现骨折术后 3W 时软骨细胞内 *Jmjd3* 被敲除小鼠的骨折线较对照明显且骨化骨痂大小和密度均较低,HE 切片显示骨化骨痂面积显著低于对照组,而软骨骨痂面积高于对照组;相反,X 线片发现 *Ezh2* 被敲除小鼠的骨痂面积明显大于对照组,且密度高于对照组,HE 组织切片显示 *Ezh2* 被敲除小鼠的骨化骨痂的钙化程度更高,骨小梁更粗更密集。最后,X 线片和 HE 切片均没有发现软骨细胞 *Jmjd3* 和 *Ezh2* 同时被敲除的小鼠与对照小鼠之间存在明显差异。**结论:**以软骨细胞特异基因敲除小鼠为基础,我们首次发现 *Jmjd3* 具有促进骨折愈合的作用,而 *Ezh2* 具有抑制骨折愈合的作用;并且发现 *Jmjd3* 和 *Ezh2* 对抗调节小鼠的骨折愈合过程,这些发现为骨折愈合治疗提供了新的分子实验基础。

关键词: *Jmjd3*; *Ezh2*; 骨折愈合; 软骨骨化; 基因敲除

中图分类号: R-33; R683 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)10-1875-07

Jmjd3 and *Ezh2* Antagonistically Regulate Fracture Healing of Bone in Mice*

WANG Xin-li[#], WANG Yu-ying^{3#}, ZHAO Xiong¹, WANG Guan-jie², WANG Yu², ZHANG Xin², ZHANG Ran², ZHANG Zhi-yar²,
YANG Bo², MA Fu-hao², XU Hong-ye², WU Xiao-hu², LEI Wei^{1Δ}, ZHANG Feng^{3Δ}

(1 Department of Orthopedics, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Brigade of Cadet, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 Department of Pathology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the roles of *Jmjd3* and *Ezh2* in the processes of bone fracture healing in mice. **Methods:** Mice with gene conditional knockout (cKO) in chondrocytes were used in this study. Male mice at 8-10 weeks old were randomly divided into 6 groups according to their genotypes, with 5 mice in each group. Mice with *Jmjd3^{fl/fl}/Col2a1-Cre^{ERT2}*, *Ezh2^{fl/fl}/Col2a1-Cre^{ERT2}* or *Jmjd3^{fl/fl}/Ezh2^{fl/fl}/Col2a1-Cre^{ERT2}* genotypes were experimental groups. Mice with *Jmjd3^{fl/fl}*, *Ezh2^{fl/fl}* or *Jmjd3^{fl/fl}/Ezh2^{fl/fl}* genotypes were control groups. The mice were given a unilateral open tibiae transverse fracture operation with intramedullary needle fixation under aseptic condition. At 3, 5 and 7 days after the operation, the mice were intraperitoneally injected tamoxifen (3 mg per day for each time) and were sacrificed 3 weeks later for X ray and histology investigations. **Results:** X ray scanning and histology measurement showed that the most suitable time for observing the results of bone fracture healing in mice was at the third week after operation. At this stage, X ray showed that the fracture line in *Jmjd3* cKO mice is clearer than the controlled group. Meanwhile, the ossified callus of *Jmjd3* cKO group is much smaller and has lower density compared with the controlled group. HE tissue slices showed that the cKO group had significantly less ossified callus and more cartilage callus than the controlled group. In contrast, the X ray showed that the callus of *Ezh2* cKO group was larger and had higher density than the controlled group. HE tissue slices showed that the calcification of ossified callus was higher in the cKO group. Besides, the trabecular bone of the cKO group was thicker and more dense. Lastly, the X ray and HE tissue slices showed that no significant difference were observed between *Jmjd3/Ezh2* double cKO and controlled group. **Conclusion:** Based on gene cKO

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81572631, 31000559)

作者简介: 王新力(1991-), 硕士研究生, 主要从事骨骼生长发育方面的研究, 电话: (029)84774541-117, E-mail: 1536157383@qq.com;

王钰莹(1988-), 硕士研究生, 主要从事骨骼生长发育方面的研究, 电话: (029)84774541-117, E-mail: wyyfmmu@163.com

共同第一作者

Δ 通讯作者: 雷伟, 博士生导师, 教授, 主任医师, 主要从事脊柱退变与重建方面的研究, 电话: (029)84771012, E-mail: leiwei@fmmu.edu.cn;

张丰, 硕士生导师, 讲师, 主要从事脊柱退变与重建方面的研究, 电话: (029)84774541-117, E-mail: zhfl975@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2017-11-17 接受日期: 2017-12-12)

mice, we firstly detected that *Jmjd3* can facilitate but *Ezh2* suppress bone fracture healing in mice. We also find that *Jmjd3* and *Ezh2* counteractually regulate the process of bone fracture healing in vivo. These findings provide a new molecular experimental basis and implications for fracture healing treatment.

Key words: *Jmjd3*; *Ezh2*; Fracture healing; Endochondral ossification; Gene knockout

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R683 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)10-1875-07

前言

骨折愈合过程与骨骼发育过程类似^[1,2],包括软骨内成骨和膜内成骨两种方式^[3-7]。近年来研究表明组蛋白甲基化修饰在基因转录调控中发挥重要作用^[8,9]。基因启动子上的组蛋白 H3 第 27 位氨基酸(赖氨酸)被 *Ezh2* 甲基化 3 个甲基(3 methylations of lysine 27 of histone H3,缩写为 H3K27me3)后,基因转录被抑制。研究发现 H3K27me3 可以被 KDM6(KDM6A,即 Utx; KDM6B,即 *Jmjd3*)降解^[10-13],提示 H3K27me3 实际上处于一种被 *Ezh2* 和 KDM6 动态调控的平衡状态。*Jmjd3* 属于 TrxG (Trithorax group)复合物^[14],与 ASH2L、RbBP5 和 BRG1 等蛋白存在相互作用^[11,15]。我们实验室发现全身纯合敲除 *Jmjd3* 基因导致小鼠软骨发育异常^[16]。因此,*Jmjd3* 是软骨内骨化过程中促进软骨成熟的一个重要表观调控分子。*Ezh2* 是 PRC2 复合物中具有催化作用的核心蛋白,是维持干细胞活性和分化所必须的。对于人类,*EZH2* 的杂合失活突变会导致 Weaver 综合征^[17],其特征是骨骼的过度生长和骨骼成熟过程加速。而在小鼠间充质干细胞中敲除 *Ezh2*,则导致小鼠个体短小和骨骼发育异常^[18]。然而 *Jmjd3* 和 *Ezh2* 在小鼠骨折愈合过程中有什么作用,目前还不清楚。因此,我们采用软骨细胞特异敲除 *Jmjd3* 或 / 和 *Ezh2* 小鼠,通过建立小鼠骨折模型,在体内观察它们对骨折愈合过程的影响,为骨折愈合治疗提供新的分子实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

Jmjd3^{fl/fl} 小鼠由中国科学院生化细胞所陈德桂教授惠赠,*Col2a1-Cre*^{ERT2} 和 *Ezh2*^{fl/fl} 小鼠购于美国 JAX 实验室。实验所用的所有基因鉴定引物均由北京六合华大基因科技有限公司合成。DL2000 DNA maker 由科昊生物工程有限责任公司提供。2x Es Taq MasterMix 由康为世纪提供。

1.2 方法

1.2.1 基因修饰小鼠繁育 其中 *Col2a1-Cre*^{ERT2} 小鼠的 Cre 基因受控于软骨细胞特异表达基因 *Col2a1* 的启动子,表达的 Cre 酶被 Tamoxifen 激活后,从细胞浆转入细胞核,从而发挥定向敲除基因的作用。*Jmjd3*^{fl/fl} 小鼠与 *Col2a1-Cre*^{ERT2} 小鼠交配两代可以产生 *Jmjd3*^{fl/fl}/*Col2a1-Cre*^{ERT2}。同样,*Ezh2*^{fl/fl} 小鼠与 *Col2a1-Cre*^{ERT2} 小鼠交配两代可以产生 *Ezh2*^{fl/fl}/*Col2a1-Cre*^{ERT2}。最后,*Jmjd3*^{fl/fl}/*Col2a1-Cre*^{ERT2} 小鼠与 *Ezh2*^{fl/fl}/*Col2a1-Cre*^{ERT2} 小鼠交配三代可以产生 *Jmjd3*^{fl/fl}/*Ezh2*^{fl/fl}/*Col2a1-Cre*^{ERT2} 小鼠。应用碱裂解法抽提小鼠尾片段 DNA,并通过 PCR 的方法进行基因型的鉴定。*Jmjd3* 的基因鉴定引物序列:*Jmjd3*-F 为 GAGACCC-CTGTTTGGTTACCAG,*Jmjd3*-R 为 GAGGCAGAACCTGAG-CAAGACC;*Ezh2* 的基因鉴定引物序列:*Ezh2*-F 为 CAT GTG CAG CTT TCT GTT CA,*Ezh2*-R 为 CAC AGC CTT TCT GCT

CAC TG;*Col2a1-Cre*^{ERT2} 的基因鉴定引物序列:*Col2a1*-F 为 CAC TGC GGG CTC TAC TTC AT,*Col2a1*-R 为 ACC AGC AGC ACT TTT GGA AG。PCR 反应条件:95℃ 预变性,3 min; 98℃ 变性,10 s;60℃ 退火,20 s;68℃ 延伸,30 s;共进行 35 个循环;68℃ 延伸,2 min。

1.2.2 实验动物分组和基因敲除 8~10 周龄雄性小鼠用于实验研究,体质量 18~25 g。将小鼠按基因型随机分为 6 组,每组 5 只:其中实验组为 *Jmjd3*^{fl/fl}/*Col2a1-Cre*^{ERT2}、*Ezh2*^{fl/fl}/*Col2a1-Cre*^{ERT2},或 *Jmjd3*^{fl/fl}/*Ezh2*^{fl/fl}/*Col2a1-Cre*^{ERT2} 组;对照组为 *Jmjd3*^{fl/fl},*Ezh2*^{fl/fl} 或 *Jmjd3*^{fl/fl}/*Ezh2*^{fl/fl} 组。所有小鼠在骨折术后均接受 Tamoxifen 处理:分别于骨折术后 3 天,5 天,7 天,腹腔注射 Tamoxifen 3 mg/次。*Jmjd3*^{fl/fl}/*Col2a1-Cre*^{ERT2} 组被 Tamoxifen 处理过的小鼠命名为 *Jmjd3*-cKO 小鼠,以此类推。实验采用同窝小鼠对照。

1.2.3 骨折模型的建立 使用 5%水合氯醛按 10 mL/kg 腹腔注射,待小鼠麻醉后,常规备皮,小鼠取仰卧位置于手术台上,络合碘常规消毒,消毒面积近端达腹股沟,远端至足趾。无菌孔巾覆盖小鼠,仅暴露右后肢。在小鼠右侧膝关节前方下方切开约 1 cm 纵行切口,暴露皮下组织和胫骨前缘。首先由腓腱处插入 22 G /0.41 mm 髓内固定针,于胫骨中上 1/3 处分离肌肉及筋膜,使用锯片锯断胫骨干后立即使用 0.9% 生理盐水冲洗胫骨表面,再将髓内固定针完全插入并对合。络合碘消毒皮肤,4-0 丝线逐层缝合切口,制成小鼠右侧胫骨骨折模型。常规给水及饮食。6 组实验动物术后成活率均为 100%,全部进入结果分析。

1.2.4 标本取材和组织学分析 颈椎脱臼法处死小鼠,取出小鼠右侧胫骨后将标本置于 4%多聚甲醛室温固定 24 h,10% EDTA 溶液室温脱钙 3 周。常规石蜡包埋、切片(厚度 4 μm)、HE 染色后显微镜下观察。

1.2.5 X-线摄影 在第四军医大学西京医院放射科进行 X-ray 扫描,得到胫骨骨折侧位二维图像。

1.2.6 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件对计量资料进行 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨折后第 3 周是观察软骨骨痂最佳时间

Col2a1,*Jmjd3*,*Ezh2* 三种基因型基因鉴定结果见图 1。*Col2a1-Cre*^{ERT2} 小鼠基因型鉴定结果(图 1A),无条带是为 WT,在 358 bp 出现高亮条带时为 *Col2a1-Cre*^{ERT2}。*Jmjd3*^{fl/fl} 小鼠基因型鉴定结果(图 1B),仅在 392 bp 出现一条高亮条带时为 WT,仅在 500 bp 出现一条高亮条带时为 *Jmjd3*^{fl/fl},在 392 bp 和 500 bp 分别出现一条带时为 *Jmjd3*^{fl/+}。*Ezh2*^{fl/fl} 小鼠基因型鉴定结果(图 1C),仅在 203 bp 出现一条高亮条带时为 WT,仅在 300 bp 出现一条高亮条带时为 *Ezh2*^{fl/fl},在 203 bp 和 300 bp 分别出现一条带时为 *Ezh2*^{fl/+}。

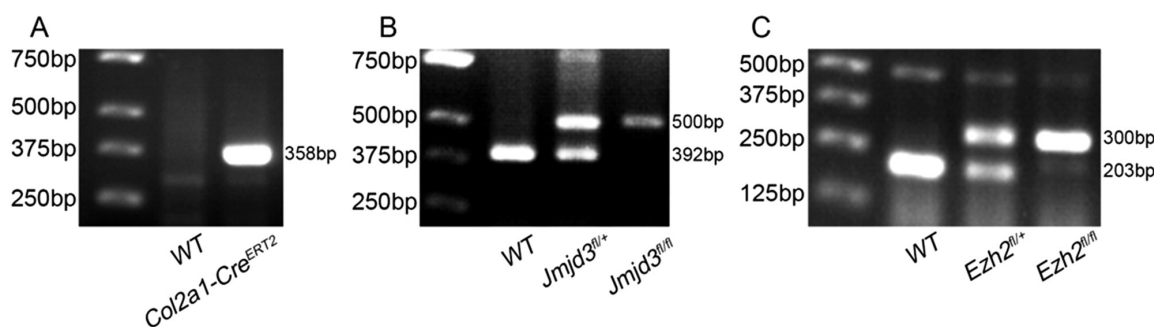


图1 小鼠基因型鉴定结果

Fig.1 Mouse genotype identification results

注: A *Col2a1-Cre^{ERT2}* 小鼠基因型鉴定结果; B *Jmjd3^{fl/fl}* 小鼠基因型鉴定结果; C *Ezh2^{fl/fl}* 小鼠基因型鉴定结果。Note: A Mouse genotype identification results of *Col2a1-Cre^{ERT2}*; B Mouse genotype identification results of *Jmjd3^{fl/fl}*; C Mouse genotype identification results of *Ezh2^{fl/fl}*.

2.2 骨折后第3周是观察软骨骨痂最佳时间

为了方便研究不同基因型小鼠骨折愈合过程,我们首先通过制备野生型小鼠骨折模型,来探寻一个判断骨折愈合效果的最佳时间点。通过对21只野生型小鼠骨折后连续6周的X线影像学检查结果的观察(图2A),同时收集本实验小鼠骨折术后1-6周HE切片进行比较(图2B),我们发现在术后1周时,骨折断端重叠错位生长,骨折线清晰,X线片和HE切片均不能观察到骨痂形成。在术后2周时,X线片显示骨折断端有片状钙化影,骨折线较模糊;HE切片显示,骨折断端附近存在较多软骨细胞,边缘可见钙化程度较低的骨痂。在术后3周时,X线片显示骨折线非常模糊,可见椭圆形或梭形膨大高密度影,骨痂整体面积相对于其他时间点达到最大值(图2A);HE切片显示此时骨折断端处软骨骨痂面积达到最大值,软骨骨痂内有不同程度的钙化(图2B)。从第4周开始直至骨折术后6周,通过影像学观察可见高密度影逐渐缩小,HE切片也显示骨折处骨痂面积减小,软骨细胞数量减少而骨痂内骨钙化的面积相对增加,此过程说明骨痂逐渐被塑形改建成为编织骨(图2A,B)。因此,通过影像学及组织学观察,骨折术后3周是观察小鼠骨折通过软骨内骨化方式愈合的最佳时间点。

2.3 敲除软骨细胞内 *Jmjd3* 导致骨折愈合速度减慢

通过影像学x线片观察(图3A),骨折术后3周时,*Jmjd3^{fl/fl}*组小鼠骨折线非常模糊,骨折断端可见均匀的高密度片状影,而*Jmjd3-cKO*组骨折线仍然明显,骨折断端高密度片状影不连续,并且整体钙化程度不高。HE病理切片观察发现(图3B),*Jmjd3^{fl/fl}*组骨折断端处可见较成熟小梁状骨,交织成网状,说明软骨骨痂已经钙化为硬骨痂。*Jmjd3-cKO*组骨折断端处局部区域尚有残存软骨组织,较多骨质矿化不完全,有少量成熟小梁状骨。*Jmjd3-cKO*组软骨骨痂数量明显多于*Jmjd3^{fl/fl}*组,而骨化骨痂数量明显少于*Jmjd3^{fl/fl}*组(图3C),差异具有统计学意义。因此,敲除软骨细胞内*Jmjd3*后,软骨内骨化过程延缓,导致骨折愈合速度减慢。

2.4 敲除软骨细胞内 *Ezh2* 使骨折愈合速度加快

骨折术后3周时,x线片显示*Ezh2^{fl/fl}*组骨折线较模糊(图4A),骨折断端周围可见点状和片状阴影,密度相对较低。*Ezh2-cKO*组骨折线非常模糊,骨折断端可见梭形高密度影,骨痂面积明显大于*Ezh2^{fl/fl}*组。HE病理切片显示(图4B),*Ezh2^{fl/fl}*

组骨折断端处有一椭圆形骨痂,骨痂内可见大量成熟骨小梁,伴有骨髓腔和骨髓组织,周围还有少量软骨细胞和纤维组织包围。*Ezh2-cKO*组骨痂钙化程度更高,骨小梁排列更加密集有序,硬骨痂面积明显大于*Ezh2^{fl/fl}*组,差异具有统计学意义(图4C)。因此,敲除软骨细胞内*Ezh2*后,加快了软骨内骨化过程,从而促进了骨折愈合。

2.5 同时敲除软骨细胞内 *Jmjd3* 和 *Ezh2* 后,骨折愈合速度未见明显差异

通过X线观察发现(图5A),骨折术后3周时,两组骨折线均较为模糊,两组骨折模型在影像学上没有明显差异。HE切片中(图5B),*Jmjd3^{fl/fl}Ezh2^{fl/fl}*组骨折断端周围可见大量蓝色的软骨细胞,大部分软骨组织尚未骨化,软骨组织周围有少量骨样组织。*Jmjd3/Ezh2-cKO*组HE切片中也未见骨化,骨折断端周围同样被大量软骨细胞包围,少量骨样组织钙化。组织形态计量学分析显示,两组软骨骨痂面积比和骨化骨痂面积比之间没有统计学差异。因此,同时敲除软骨细胞内*Jmjd3*和*Ezh2*后,软骨内骨化过程未受到明显影响,骨折愈合速度未见明显差异。

3 讨论

实验以软骨细胞特异性基因敲除小鼠骨折模型为基础,首次发现*Jmjd3*可以促进骨折愈合,而*Ezh2*具有抑制骨折愈合的作用。我们还进一步发现*Jmjd3*和*Ezh2*在调节小鼠骨折愈合过程中具有拮抗作用。这些发现为将来治疗骨折愈合提供了新的分子实验基础,也为研发骨再生药物提供了新的思路。

探索骨折愈合的发生机制不仅可以帮助治疗骨折延迟愈合或不愈合,而且有利于研发骨再生药物。骨折愈合是指骨折断端间的组织修复反应,以恢复骨的正常结构与功能。骨折愈合过程是一个复杂的组织学、生物学、内分泌学及生物力学的动态过程^[19],主要分为诱导期、炎症期、软骨痂期、硬骨痂期和重建期,骨折愈合中阻碍任何一个环节均会影响骨折的愈合^[20]。骨损伤模型的建立是研究骨修复机制的基础,动物骨折模型一般用于骨折愈合过程的研究^[21-24]。尽管大型动物的骨骼可以被稳定的植入^[25],但是其主要弊端是在骨骼愈合过程中需要较长时间的圈养,并且消耗大量的科研经费。因此,小鼠骨折模型越来越被认同和广泛应用^[26]。现阶段骨折模型主要有稳定骨折愈合模型、不稳定骨折愈合模型,前者以膜内成骨为主,后者以

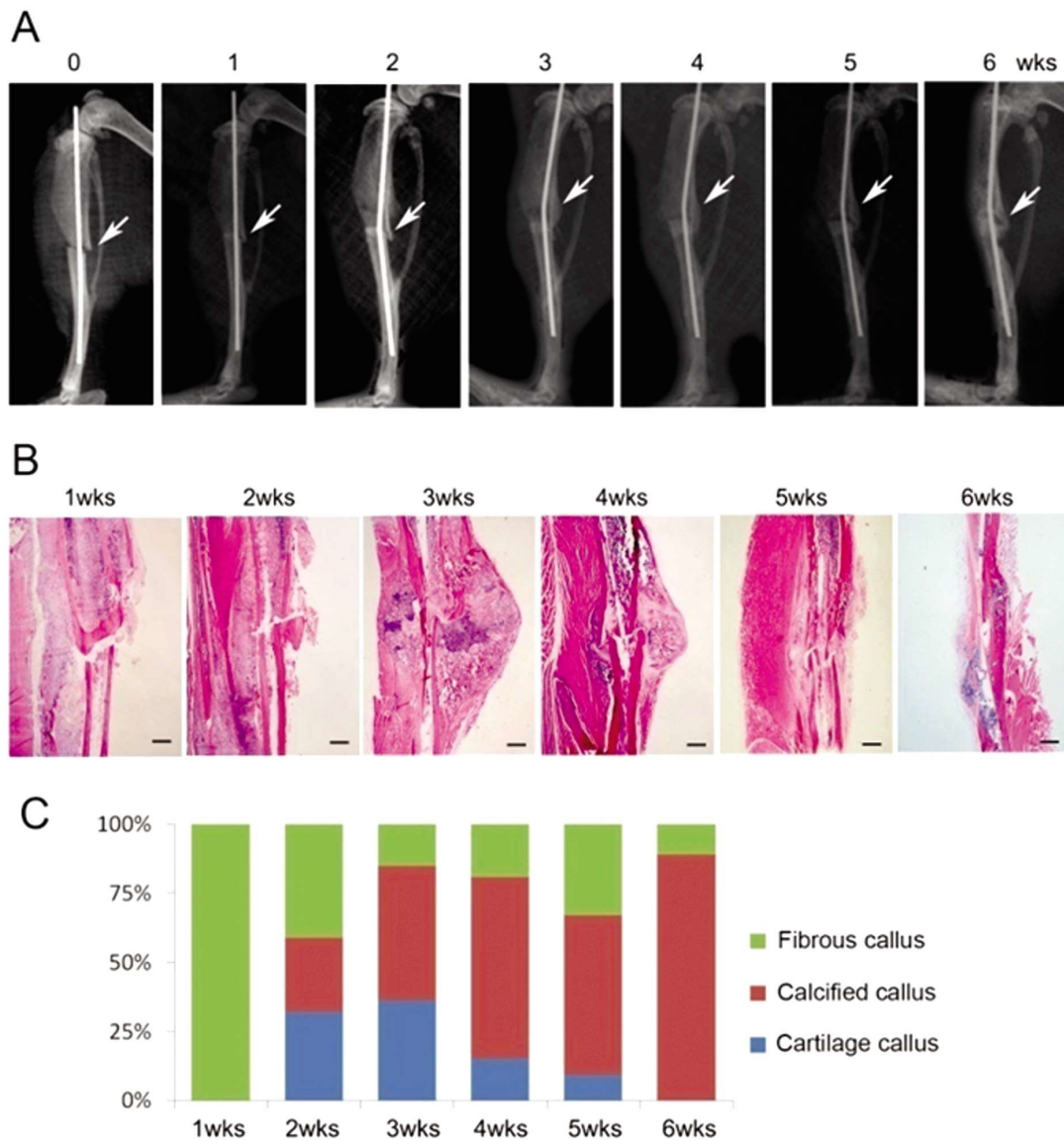


图2 骨折后第3周是观察软骨骨痂最佳时间

Fig.2 The most suitable time for observing Cartilage callus was at the third week after operation

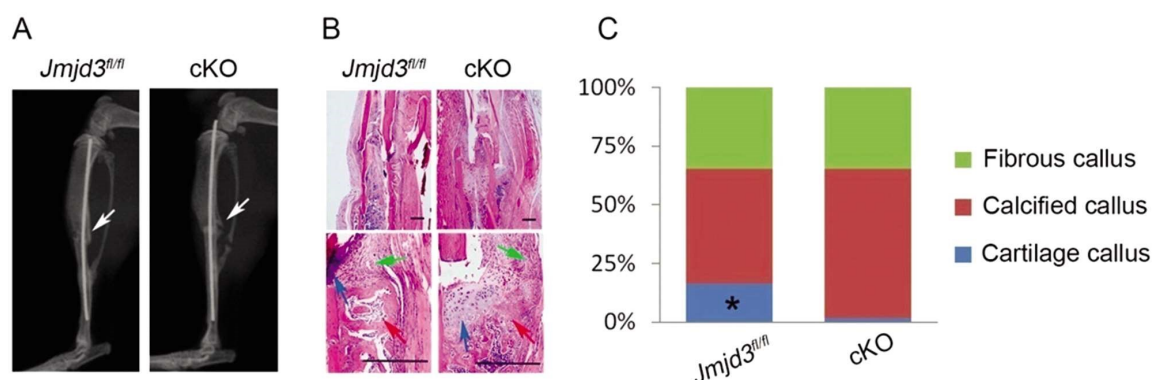
注:A 小鼠骨折术后0-6周X线影像学结果,图中白色箭头指向骨折断端处的骨痂部分;B 小鼠骨折术后1-6周组织HE切片结果,比例尺:200 μm;C 小鼠骨折术后1-6周骨痂面积比柱状图。

Note: A 0-6 weeks X ray results of mice post bone fracture operation, the white arrows indicate the callus around the fracture site; B 1-6 weeks HE staining histology results of mice post bone fracture operation. Scale bar, 200 μm; C 1-6 weeks Callus area ratio histogram of mice post bone fracture operation.

软骨内成骨为主。骨折处骨髓间充质细胞及骨膜下骨生成细胞可直接分化为成骨细胞,在骨折端内外形成骨样组织并逐渐骨化成新骨,即膜内成骨;而软骨内成骨过程主要是骨折断端间的间充质细胞先分化为软骨细胞,形成软骨痂,随后软骨细胞增生、成熟肥大、最后骨化。近年来对于稳定性及非稳定性骨折的模型争议较多^[27,28]。非稳定性骨折愈合过程中软骨骨痂形成较多,但创伤大,周期长,人为技术原因导致骨折程度不一致等因素而不易统一标准,并且与临床骨折愈合过程有一定差异。相反,稳定性骨折愈合模型尽管软骨骨痂形成相对较少,但是创伤小,周期短,可以更好地模拟临床情况,同时有助于排除周围组织影响进而单一研究骨折愈合的细胞和分子机制,也有利于更好地筛选促进骨折愈合的分子和相关措施^[29]。因此,本实

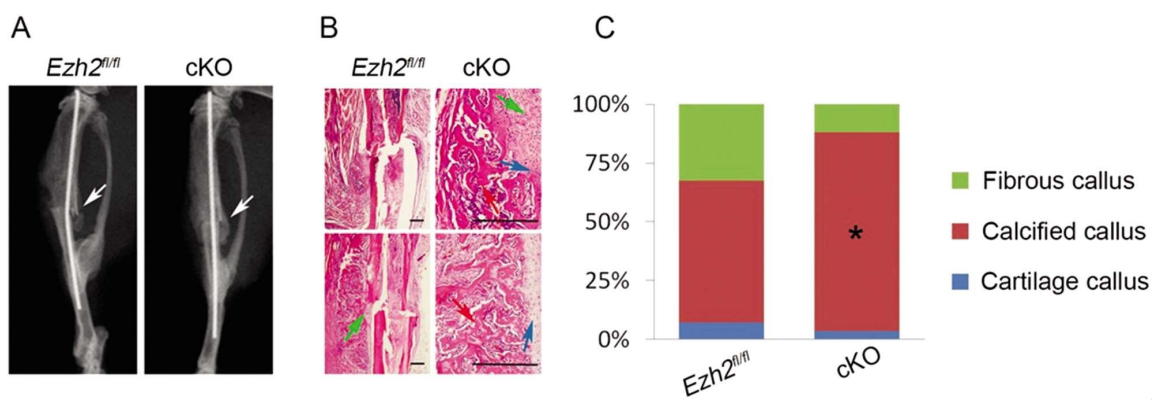
验选择了骨髓腔中插入固定针的稳定性胫骨骨折模型。

基因转录的表观遗传调控主要通过DNA甲基化和组蛋白修饰,组蛋白修饰包括甲基化、乙酰化和磷酸化等。近年来研究表明组蛋白甲基化修饰在基因转录调控中发挥重要作用^[30]。质谱研究表明,在胚胎干细胞中15%的H3K27呈现三甲化状态(H3K27me3)^[31]。H3K27me3是基因转录抑制的标志,其去甲基化后可以激活基因表达,目前共鉴定出JMJD3与UTX两种H3K27去甲基化酶,二者结构相似。JMJD3,是含有JmJc结构域组蛋白去甲基化酶中的一个成员,它和另一种组蛋白去甲基化酶UTX可以特异性地去除H3K27二甲基化和三甲化位点^[32,33]。EZH2是PcG家族中一种进化高度保守的基因,EZH2蛋白是PRC2的催化活性亚单位,能够催化H3K27me3。

图3 敲除软骨细胞内 *Jmjd3* 导致骨折愈合速度减慢Fig.3 *Jmjd3* conditional knockout in chondrocytes suppressed bone fracture healing in mice

注:A:实验组和对照组小鼠骨折术后第3周影像学结果,图中白色箭头指向骨折断端处的骨痂部分;B:实验组和对照组小鼠骨折术后3周组织HE切片结果。下方图片分别为其上方图片的局部放大图。绿色箭头指向纤维骨痂,红色箭头指向硬骨痂,蓝色箭头指向软骨骨痂,比例尺:200 μ m;C:实验组和对照组小鼠骨折术后第3周骨痂面积比柱状图。* $P < 0.05$ vs 实验组。

Note: A X ray results of experimental group and controlled group at the third week post bone fracture operation, the white arrows indicate the callus around the fracture site; B HE staining histology results of experimental group and controlled group at the third week post bone fracture operation. The panels below are magnified area in the upper panels, respectively. The green arrows indicate the fibrous callus, the red arrows indicate the calcified callus, the blue arrows indicate the cartilage callus. Scale bar, 200 μ m; C Callus area ratio histogram of experimental group and controlled group at the third week post bone fracture operation. * $P < 0.05$ vs cKO group.

图4 敲除软骨细胞内 *Ezh2* 导致骨折愈合速度加快Fig.4 *Ezh2* conditional knockout in chondrocytes facilitated bone fracture healing in mice

注:A:实验组和对照组小鼠骨折术后第3周影像学结果,图中白色箭头指向骨折断端处的骨痂部分;B:实验组和对照组小鼠骨折术后3周组织HE切片结果。下方图片分别为其上方图片的局部放大图。绿色箭头指向纤维骨痂,红色箭头指向硬骨痂,蓝色箭头指向软骨骨痂,比例尺:200 μ m;C:实验组和对照组小鼠骨折术后第3周骨痂面积比柱状图。* $P < 0.05$ vs 对照组。

Note: A X ray results of experimental group and controlled group at the third week post bone fracture operation, the white arrows indicate the callus around the fracture site; B HE staining histology results of experimental group and controlled group at the third week post bone fracture operation. The panels below are magnified area in the upper panels, respectively. The green arrows indicate the fibrous callus, the red arrows indicate the calcified callus, the blue arrows indicate the cartilage callus. Scale bar, 200 μ m; C Callus area ratio histogram of experimental group and controlled group at the third week post bone fracture operation. * $P < 0.05$ vs controlled group.

H3K27me3 被认为是在 PcG 沉默机制中起作用的主要存在形式,有效的 H3K27 甲基化要求 PRC2 几个核心组分(EZH2 和辅因子 EED 及 SUZ12) 共同协调^[34,35]。因此 H3K27me3 实际上处于一种被 *Ezh2* 和 KDM6 动态调控的平衡状态。

小鼠骨折愈合过程与人类相比,愈合周期明显较短^[26,36,37]。一般而言,小鼠骨折后2周即可观察到软骨骨痂,骨折重塑开始于骨折后3周,并持续到骨折后8周结束。为了探寻一个判断骨折愈合效果的最佳时间点,我们首先对野生型小鼠进行了骨折建模,通过连续6周的X线影像学检查结果的观察,同时收集本实验小鼠骨折术后1-6周HE切片进行比较,发现在术

后3周时,X线影像学显示骨痂整体面积相对于其他时间点达到最大值,HE切片显示此时骨折断端处软骨骨痂面积达到最大值。因此,通过影像学及组织学观察,骨折术后3周是观察小鼠骨折后通过软骨内骨化方式愈合的最佳时间点。有研究表明,利用细胞特异性 Tamoxifen 诱导基因重组的方法来追踪小鼠肥大软骨细胞的命运,发现这些肥大软骨细胞可以通过软骨-骨转换得以幸存,在胎儿和出生后软骨内转变为成骨细胞,并持续到成年后,该研究证明了软骨细胞可以直接分化为成骨细胞和骨细胞^[38]。在本实验中,骨折术后通过 Tamoxifen 特异性诱导敲除软骨细胞内 *Jmjd3*,在术后3周时,骨化骨痂显著减

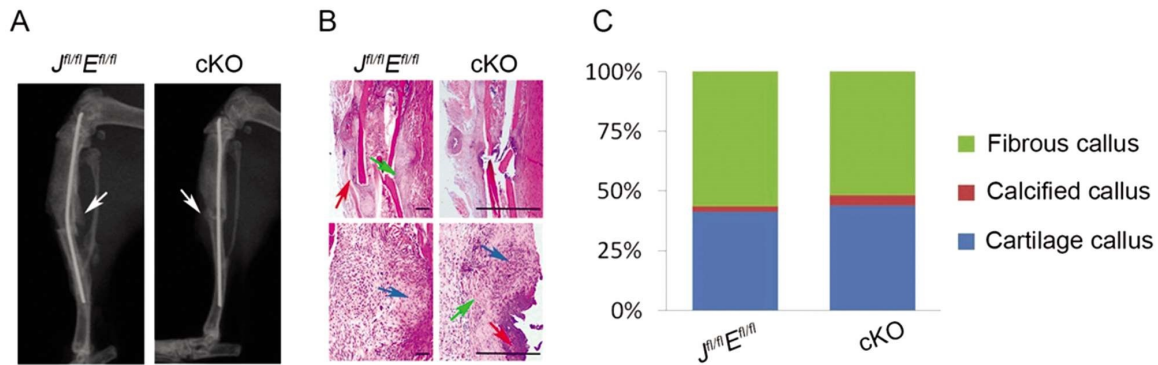


图5 同时敲除软骨细胞内 *Jmjd3* 和 *Ezh2* 未能明显改变骨折愈合速度

Fig.5 *Jmjd3* and *Ezh2* conditional knockout in chondrocytes did not affect bone fracture healing in mice

注:A:实验组和对照组小鼠骨折术后第3周影像学结果,图中白色箭头指向骨折断端处的骨痂部分;B:实验组和对照组小鼠骨折术后3周组织HE切片结果。下方图片分别为其上方图片的局部放大图。绿色箭头指向纤维骨痂,红色箭头指向硬骨痂,蓝色箭头指向软骨骨痂,比例尺:200 μ m;C:实验组和对照组小鼠骨折术后第3周骨痂面积比柱状图。图中 *Jmjd3^{fl/fl} Ezh2^{fl/fl}* 简称为 *J^{fl/fl} E^{fl/fl}*。

Note: A X ray results of experimental group and controlled group at the third week post bone fracture operation, the white arrows indicate the callus around the fracture site; B HE staining histology results of experimental group and controlled group at the third week post bone fracture operation. The panels below are magnified area in the upper panels, respectively. The green arrows indicate the fibrous callus, the red arrows indicate the calcified callus, the blue arrows indicate the cartilage callus. Scale bar, 200 μ m; C Callus area ratio histogram of experimental group and controlled group at the third week post bone fracture operation. *Jmjd3^{fl/fl} Ezh2^{fl/fl}* is abbreviated as *J^{fl/fl} E^{fl/fl}*.

少,仍然可见大量软骨细胞,软骨骨痂数量明显多于对照组,说明软骨内骨化过程延迟,骨折愈合速度减慢。该结果与我们以前报道的 *Jmjd3* 具有促进软骨成熟和骨化的结果一致^[16],说明 *Jmjd3* 在骨折和发育过程中均具有促进软骨细胞向成骨方向分化的过程。相反,骨折后特异性敲除软骨细胞内 *Ezh2*,术后3周发现骨化骨痂明显增多,且骨化程度更加成熟。该结果与 *Ezh2* 突变失活引起 Weaver 综合征患者的骨化加速情况一致。Lui JC 实验室利用具有完全敲除 *Ezh1* 的小鼠模型和 *Ezh2* 的软骨特异性敲除来探索 PRC2 调节骨骼生长的机制,发现 PRC2 对生长板软骨细胞的增殖和肥大都很重要^[39]。这些结果说明 *Ezh2* 具有抑制软骨内骨化的作用。该结果也与很多研究发现 *Ezh2* 具有维持干细胞处于未分化状态和阻止细胞分化的结果一致^[40]。以上结果也说明 *Jmjd3* 和 *Ezh2* 在软骨骨化过程中发挥拮抗的作用,为了进一步验证该假说,我们同时敲除软骨细胞内 *Jmjd3* 和 *Ezh2*,结果发现实验组和对照组的软骨骨痂面积、骨化骨痂面积,骨折愈合情况都没有明显差异,证实了 *Jmjd3* 和 *Ezh2* 在骨折愈合过程中确实具有拮抗作用。

综上所述,本实验通过建立小鼠胫骨骨折模型,发现单独敲除软骨细胞内 *Jmjd3* 后导致骨折愈合减慢,而敲除软骨细胞内 *Ezh2* 后可加快骨折愈合速度。同时敲除软骨细胞内 *Jmjd3* 和 *Ezh2*,发现软骨骨化和骨折愈合速度均无明显改变,说明 *Jmjd3* 和 *Ezh2* 拮抗调节小鼠骨折愈合。这种拮抗作用是否可以被用于调节骨折愈合的过程或其他骨折愈合疾病,比如异位骨化,还需要进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Gerstenfeld L C, Cullinane D M, Barnes G L, et al. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation[J]. J Cell Biochem, 2003, 88(5): 873-884
- [2] Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, et al. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair[J]. J Biol Chem, 2002, 277(33): 30177-30182
- [3] He X, Bougioukli S, Ortega B, et al. Sox9 positive periosteal cells in fracture repair of the adult mammalian long bone[J]. Bone, 2017, 103: 12-19
- [4] Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A. Bone injury and fracture healing biology[J]. Biomed Environ Sci, 2015, 28(1): 57-71
- [5] Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 13(1): 27-38
- [6] Lefebvre V, Bhattaram P. Vertebrate skeletogenesis [J]. Curr Top Dev Biol, 2010, 90: 291-317
- [7] Kronenberg H M. Developmental regulation of the growth plate[J]. Nature, 2003, 423(6937): 332-336
- [8] Jenuwein T, Allis C D. Translating the histone code[J]. Science, 2001, 293(5532): 1074-1080
- [9] Strahl B D, Allis C D. The language of covalent histone modifications [J]. Nature, 2000, 403(6765): 41-45
- [10] Agger K, Cloos P A, Christensen J, et al. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development[J]. Nature, 2007, 449(7163): 731-734
- [11] De Santa F, Totaro M G, Prosperini E, et al. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing[J]. Cell, 2007, 130(6): 1083-1094
- [12] Hong S, Cho Y W, Yu L R, et al. Identification of Jmjd3 domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(47): 18439-18444
- [13] Xiang Y, Zhu Z, Han G, et al. JMJD3 is a histone H3K27 demethylase[J]. Cell Res, 2007, 17(10): 850-857
- [14] Cao R, Wang L, Wang H, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing [J]. Science, 2002, 298 (5595): 1039-1043
- [15] Miller S A, Mohn S E, Weinmann A S. Jmjd3 and UTX play a demethylase-independent role in chromatin remodeling to regulate

- T-box family member-dependent gene expression [J]. *Mol Cell*, 2010, 40(4): 594-605
- [16] Zhang F, Xu L, Xu L, et al. *JMJD3* promotes chondrocyte proliferation and hypertrophy during endochondral bone formation in mice[J]. *J Mol Cell Biol*, 2015, 7(1): 23-34
- [17] Gibson W T, Hood R L, Zhan S H, et al. Mutations in *EZH2* cause Weaver syndrome[J]. *Am J Hum Genet*, 2012, 90(1): 110-118
- [18] Dudakovic A, Camilleri E T, Xu F, et al. Epigenetic Control of Skeletal Development by the Histone Methyltransferase *Ezh2*[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(46): 27604-27617
- [19] 武春明,袁慧敏,杨迪,等.续断水提液对小鼠胫骨骨折愈合影响的实验研究[J].*中国中医急症*, 2016, (09): 1682-1685
- Wu Chun-ming, Yuan Hui-min, Yang Di, et al. Experimental Study on Promoting Effect of Radix Dipsaci Extract on Tibial Fracture Healing in Mice under Micro-CT[J]. *JETCM*, 2016, (09): 1682-1685
- [20] 刘远航.细菌脂多糖通过 TLR-4 通路抑制小鼠成骨细胞分化及骨质矿化的分子机制研究[D].南方医科大学, 2016
- Liu Yuan-hang. The research of Toll like receptor (TLR)-4-dependence of the lipopolysaccharide (LPS)-induced inhibition of osteoblast differentiation[D]. Southern Medical University, 2016
- [21] Ibrahim N, Mohamad S, Mohamed N, et al. Experimental fracture protocols in assessments of potential agents for osteoporotic fracture healing using rodent models [J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(14): 1642-1650
- [22] Reifenhath J, Angrisani N, Lalk M, et al. Replacement, refinement, and reduction: necessity of standardization and computational models for long bone fracture repair in animals [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2014, 102(8): 2884-2900
- [23] Sabalic S, Kodvanj J, Pavic A. Comparative study of three models of extra-articular distal humerus fracture osteosynthesis using the finite element method on an osteoporotic computational model [J]. *Injury*, 2013, 44(Suppl 3): S56-S61
- [24] Blokhuis T J, Buma P, Verdonchot N, et al. BMP-7 stimulates early diaphyseal fracture healing in estrogen deficient rats[J]. *J Orthop Res*, 2012, 30(5): 720-725
- [25] Walschot L H, Aquarius R, Schreurs B W, et al. Osteoconduction of impacted porous titanium particles with a calcium-phosphate coating is comparable to osteoconduction of impacted allograft bone particles: in vivo study in a nonloaded goat model[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2012, 100(6): 1483-1489
- [26] 赵毅,夏永宁,于铁成.小鼠骨折及不同治疗方式模型的研究进展[J].*转化医学电子杂志*, 2017, (06): 83-90
- Zhao Yi, Xia Yong-ning, Yu Tie-cheng. Research progress on bone fracture and different treatments in mouse models[J]. *E-J Transl Med*, 2017, (06): 83-90
- [27] Manassero M, Decambon A, Huu T B, et al. Establishment of a Segmental Femoral Critical-size Defect Model in Mice Stabilized by Plate Osteosynthesis[J]. *J Vis Exp*, 2016, (116)[Epub ahead of print]
- [28] Ning B, Zhao Y, Buza J I, et al. Surgically induced mouse models in the study of bone regeneration: Current models and future directions (Review)[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(3): 1017-1023
- [29] 温轩,谢杨丽,苏楠,等.小鼠胫骨稳定性骨折模型制作及评价[J].*第三军医大学学报*, 2013, (05): 404-407
- Wen Xuan, XieYang-li, Su Nan, et al. Preparation and evaluation of mouse model of stable tibial fracture[J]. *J Third Mil Med Univ*, 2013, (05): 404-407
- [30] Burchfield J S, Li Q, Wang H Y, et al. *JMJD3* as an epigenetic regulator in development and disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 67: 148-157
- [31] 胡姗,韩聪,胡建宏,等.组蛋白去甲基化酶 *JMJD3* 研究进展[J].*生物技术通报*, 2017, (10): 1-9
- Hu Shan, Han Cong, Hu Jian-hong, et al. Research progress on histone demethylase *JMJD3*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, (10): 1-9
- [32] Manna S, Kim J K, Bauge C, et al. Histone H3 Lysine 27 demethylases *Jmjd3* and *Utx* are required for T-cell differentiation [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8152
- [33] Agger K, Cloos P A, Christensen J, et al. *UTX* and *JMJD3* are histone H3K27 demethylases involved in *HOX* gene regulation and development[J]. *Nature*, 2007, 449(7163): 731-734
- [34] Hock H. A complex Polycomb issue: the two faces of *EZH2* in cancer [J]. *Genes Dev*, 2012, 26(8): 751-755
- [35] 熊喜峰,刘志河.*EZH2* 与 β -catenin 在骨肉瘤中的研究进展[J].*中国矫形外科杂志*, 2015, (05): 434-437
- Xiong Xi-feng, Liu Zhi-he. Research progress of *EZH2* and β -catenin in osteosarcoma [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2015, (05): 434-437
- [36] Sang X G, Wang Z Y, Cheng L, et al. Analysis of the mechanism by which nerve growth factor promotes callus formation in mice with tibial fracture[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(4): 1376-1380
- [37] 鲍全伟.Wnt/ β -catenin 信号通路在成骨细胞终末分化及骨折重塑期中的作用及机制研究[D]. 第三军医大学, 2016
- Bao Quan-wei. The role and mechanism of Wnt/ β -catenin signaling pathway in terminal differentiation of osteoblasts and remodeling process of fracture healing [D]. Third Military Medical University, 2016
- [38] Yang L, Tsang K Y, Tang H C, et al. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation [M]. 2014
- [39] Lui J C, Garrison P, Nguyen Q, et al. *EZH1* and *EZH2* promote skeletal growth by repressing inhibitors of chondrocyte proliferation and hypertrophy[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13685
- [40] Chou R H, Chiu L, Yu Y L, et al. The potential roles of *EZH2* in regenerative medicine[J]. *Cell Transplant*, 2015, 24(3): 313-317