·实验研究论著·

Indian Hedgehog信号通路在软骨细胞成熟及转分化过程中的调控作用

王欢博[1] 贺婷[2] 郑超[1] 卢玮光[1] 范静[1] 颉强[3] 杨柳[1,2]

【摘要】 目的 探究Indian Hedgehog(IHH)信号通路对软骨内成骨过程中软骨细胞成熟以及转分化的影响。**方法** 取10日龄野生型小鼠的胫骨组织,采用原位杂交和免疫组织化学染色检测生长板区域IHH信号通路相关分子*Ihh*、*Ptch1*和*Gli1*的表达水平。构建肥大软骨细胞特异性*Ihh*基因敲除小鼠($Col10a1^{Cre/+}; Ihh^{null/C}$),并采用影像学检查和阿利新蓝染色评估该小鼠的骨骼发育状况。构建肥大软骨细胞IHH信号通路持续激活小鼠($Col10a1^{Cre/+}; R26Smo^{M2/M2}$和$Col10a1^{Cre/+}; Ptch1^{LacZ/C}$),采用HE染色、原位杂交和TUNEL染色分别对受精15.5天胎鼠胫骨组织形态结构、*Ihh*(肥大软骨细胞分子标志物)和*Col1a1*(成骨细胞分子标志物)以及肥大软骨细胞凋亡水平进行检测;另外应用HE染色对10日龄小鼠的胫骨组织进行组织学分析。**结果** 肥大软骨细胞合成分泌IHH,但不表达*Ptch1*和*Gli1*。抑制肥大软骨细胞合成IHH蛋白会导致出生后小鼠出现侏儒症;X线检查结果显示小鼠出现严重的骨骼发育不良,包括胸廓狭小、球形头骨以及椎骨发育异常等表现。持续启动IHH信号通路时,胚胎早期软骨细胞成熟分化过程虽未见异常,但是出生后小鼠的骨小梁、骨内膜以及皮质骨等结构均出现一定的异常表现。**结论** IHH信号通路虽然不参与肥大软骨细胞的终末分化过程,但在软骨细胞转分化的过程中起到了重要的调控作用。

【关键字】 Indian Hedgehog信号通路;软骨内成骨;肥大软骨细胞;转分化

Effect of Indian Hedgehog Signaling on Maturation and Transdifferentiation of Chondrocytes. *WANG Huan-bo[1], HE Ting[2], ZHENG Chao[1], LU Wei-guang[1], FAN Jing[1], JIE Qiang[3], YANG Liu[1,2]. [1]Institute of Orthopaedic Surgery, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; [2]Medical Research Institute, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China; [3]Pediatric Orthopaedics Hospital, Honghui Hospital Affiliated to Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710054, China*

Corresponding author: YANG Liu, E-mail: yangliu@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the effect of Indian Hedgehog (IHH) signaling on the maturation and transdifferentiation of chondrocytes in endochondral ossification. **Methods** We utilized *in situ* hybridization and immunohistochemistry to detect the expression of IHH signaling-related molecules (*Ihh*, *Ptch1* and *Gli1*) on tibia sections of wild type mice at P10. Next, we ablated *Ihh* gene in hypertrophic chondrocytes to establish $Col10a1^{Cre/+}; Ihh^{null/C}$ mice. We evaluated the skeletal development of the mice via X-ray and Alcian blue staining. Finally, we also established $Col10a1^{Cre/+}; R26Smo^{M2/M2}$ mice and $Col10a1^{Cre/+}; Ptch1^{LacZ/C}$ mice in which IHH signaling was consistently activated in hypertrophic chondrocytes. We used HE staining, *in situ* hybridization and TUNEL assay to detect bone structure, the molecular markers of hypertrophic chondrocytes and osteoblasts and the situation of cell apoptosis on tibia sections of mice at E15.5. In addition, histological analysis on the tibias of these mice were performed by HE staining. **Results** Hypertrophic chondrocytes synthesized and secreted IHH, but they did not express *Ptch1* and *Gli1*. Inhibiting the synthesis of IHH in hypertrophic chondrocytes led to dwarfism at postnatal stage. X-ray analysis revealed abnormal skeletal development, including small rib cage, spherical skull and abnormal vertebra. Although constitutive activation of IHH signaling did not impinge on the maturation of chondrocytes in early embryo, there were abnormal manifestations in primary spongiosa, endosteum and cortical bone at postnatal stage. **Conclusion** IHH

DOI:10.3969/j.issn.1674-8573.2021.06.001

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81772377、82002261);陕西省创新能力支撑项目计划(S2020-ZC-0036)

作者单位:1. 空军军医大学附属西京医院骨科,西安 710032;2. 西北工业大学医学研究院,西安 710072;3. 西安交通大学医学院附属红会医院儿童骨病医院,西安 710054

通信作者:杨柳,E-mail:yangliu@fmmu.edu.cn

signaling pathway does not regulate the terminal differentiation of hypertrophic chondrocytes, but it plays a critical role in cartilage-to-bone transition.

【**Key words**】 Indian Hedgehog signaling; Endochondral ossification; Hypertrophic chondrocyte; Trans-differentiation

软骨内成骨是高等脊椎动物骨形成的主要方式，是软骨组织不断生长、退化而后被骨组织取代的骨发生过程。该过程由间充质干细胞凝聚形成软骨雏形开始，软骨细胞不断增殖、分化和凋亡。软骨膜的骨祖细胞分化成为成骨细胞，与血管组织一起侵入到退化的软骨基质中，分泌大量骨基质形成骨小梁等结构[1]。先前的研究认为凋亡是肥大软骨细胞的最终归宿[2]，然而近年来人们利用谱系追踪的研究方法证实了在软骨内成骨过程中肥大软骨细胞能够向成骨细胞分化，有助于软骨内成骨[3-6]。虽然已有研究发现经典的Wnt信号通路及其下游的IRX3和IRX5分子可以调控肥大软骨细胞的分化方向[7-9]，但是软骨细胞向成骨细胞转分化过程的重要意义以及潜在的分子调控机制仍未详尽阐明。

Hedgehog（HH）信号通路在物种间具有高度的保守性，其在胚胎生长发育、成体干细胞自稳态以及肿瘤发生发展等方面起到了关键的调控作用[10-12]。细胞合成分泌的HH蛋白能够启动HH信号通路。在哺乳动物中已经发现了三种HH基因：Sonic hedgehog（Shh）、Desert hedgehog（Dhh）和Indian hedgehog（Ihh）。HH信号通路的启动需要HH蛋白、PTCH受体、SMO受体以及下游转录分子GLI的参与。两种跨膜受体PTCH和SMO在HH信号通路中完成重要的信号接收和传导工作。当缺乏HH信号时，PTCH会抑制SMO的活性，抑制HH信号通路传导；当HH信号增强时，HH与PTCH的结合会启动SMO，SMO被磷酸化进而启动下游通路。

目前，有大量的研究已经证实Indian Hedgehog（IHH）信号通路对骨骼生长发育以及稳态维持具有不可或缺的功能作用[10-11]。IHH能够直接调节生长板软骨细胞的增殖，而且其与PTHrP组成的负反馈环路能够严格调节生长板软骨细胞的肥大分化过程[13-14]。另外IHH还能够调控软骨膜的骨祖细胞向成骨细胞分化，促进软骨内成骨过程[15]。但IHH信号通路是否参与软骨细胞向成骨细胞的转分化过程尚不清楚。

本研究通过构建基因修饰小鼠，特异性调节肥大软骨细胞及其子代细胞中的IHH信号通路的活性，探索IHH信号通路对肥大软骨细胞分化方向的影响，旨在阐明IHH信号通路在软骨细胞成熟以及转分化过程中的调控作用。

材料与方法

一、实验动物

*Col10a1-Cre*小鼠由香港大学Kathryn S. E. Cheah教授馈赠[3]；*Rosa26-SmoM2*小鼠由哈佛大学Andrew McMahon教授馈赠[16]；*Ihh-floxed*小鼠（$Ihh^{C/C}$）由哈佛大学Beate Lanske教授馈赠[17]；*β-actin Cre*小鼠由加州大学洛杉矶分校Gail Martin教授馈赠[18]；*Ptch1-floxed*小鼠（$Ptch1^{C/C}$）由昆士兰大学Brandon Wainwright教授馈赠[19]；*Ptch1-LacZ*小鼠由斯坦福大学Matthew P. Scott教授馈赠[20]。

为了探究肥大软骨细胞合成的IHH蛋白对软骨内骨化的影响，我们构建了肥大软骨细胞特异性*Ihh*基因敲除小鼠：先由*Ihh-floxed*小鼠与*β-actin Cre*小鼠杂交产生*β-actin Cre*; $Ihh^{null/+}$小鼠，再与野生型小鼠杂交获得$Ihh^{null/+}$小鼠，最终与$Col10a1^{Cre/+}$; $Ihh^{C/+}$小鼠杂交获得$Col10a1^{Cre/+}$; $Ihh^{null/C}$小鼠（对照组为$Col10a1^{Cre/+}$; $Ihh^{null/+}$小鼠）。为了明确IHH信号通路是否参与肥大软骨细胞的转分化过程，我们构建了肥大软骨细胞特异性IHH信号通路持续启动小鼠：①$Col10a1^{Cre/+}$; $R26Smo^{M2/M2}$小鼠（对照组为$Col10a1^{Cre/+}$小鼠）；②$Col10a1^{Cre/+}$; $Ptch1^{LacZ/C}$小鼠，主要敲除了*Ptch1*基因的3号外显子序列（*Ptch1-E3*），由*Ptch1-lacZ*小鼠与$Col10a1^{Cre/+}$; $Ptch1^{C/+}$小鼠杂交最终获得（对照组为$Col10a1^{Cre/+}$; $Ptch1^{LacZ/+}$小鼠）。构建方式见图1。所有小鼠均为*SPF*级，饲养于空军军医大学实验动物中心，所有动物实验操作均严格遵守《空军军医大学实验动物福利伦理规范》。

二、主要仪器与试剂

（一）主要仪器

石蜡切片机（Leica公司，德国）；纯水机（Millipore公司，美国）；显微成像系统（Olympus公司，日本）；Senograph 600T Senix HF X线机（GE公司，美国）。

（二）主要试剂

SHH抗体（Santa Cruz公司，美国）；RNA酶、DNA酶、蛋白酶K以及TUNEL染色试剂盒来源于瑞士Roche公司；苏木精、伊红、阿利新蓝染液、核固红

染液、DAB显色剂以及柠檬酸盐抗原修复液来源于美国Sigma公司；^{35}S-UTP（Amersham Biosciences公司，美国）。

三、样本收集与切片制备

将10日龄小鼠行安乐死（吸入麻醉后颈椎脱臼）后取胫骨组织，受精15.5天孕鼠行安乐死后取胎鼠胫骨组织。随后依次进行4%多聚甲醛固定、EDTA脱钙、梯度酒精脱水、透明及浸蜡包埋等操作，最终制作5 μm石蜡切片备用。

四、组织学分析

取10日龄$Col10a1^{Cre/+}$; $Ihh^{null/C}$小鼠胫骨组织石蜡切片，常规脱蜡、水化后，入1%阿利新蓝染液（pH 2.5）染色30 min，流水冲洗5 min后，再入0.1%核固红染液复染10 min，又经流水冲洗1 min后，依次进行梯度酒精脱水、透明、中性树脂封片。软骨基质中的酸性黏液物质能够与阿利新蓝结合，呈现亮蓝色。

取受精15.5天胎鼠（$Col10a1^{Cre/+}$; $Ptch1^{LacZ/C}$和$Col10a1^{Cre/+}$; $Ptch1^{LacZ/+}$）或10日龄小鼠（$Col10a1^{Cre/+}$; $R26Smo^{M2/M2}$和$Col10a1^{Cre/+}$）胫骨组织石蜡切片，常规脱蜡、水化后，苏木精染液染色5 min，分化液分化3 min后自来水冲洗，而后入伊红染液1 min，依次进行梯度酒精脱水、透明、中性树脂封片。

五、原位杂交

（一）探针制备

*Ptch1-E3*的cDNA来源于香港大学Kathryn S. E. Cheah教授；*Ihh*的cDNA来源于哈佛大学Andrew P. McMahon教授；*Ptch1*的cDNA来源于麻省总医院Henry M. Kronenberg教授；*Cre*的cDNA来源于南加州大学Takahiro Ohyama教授；*Gli1*的cDNA来源于多伦多大学Chi-chung Hui教授；*Col1a1*的cDNA来源于弗朗西斯·克里克研究所Robin Lovell-Badge教授。经限制性内切酶消化、PCR扩增，同位素^{35}S-UTP标记和纯化后，分装保存于-80 ℃冰箱备用。

（二）原位杂交

预杂交：取受精15.5天胎鼠（$Col10a1^{Cre/+}$; $Ptch1^{LacZ/C}$和$Col10a1^{Cre/+}$; $Ptch1^{LacZ/+}$）或10日龄野生型小鼠胫骨组织石蜡切片行常规脱蜡复水后，蛋白酶K消化5 min，再浸入中性多聚甲醛固定液3 min，经洗涤后浸入乙酸酐溶液10 min，并洗涤、梯度酒精脱水，最后晾干备用。杂交：用杂交液稀释探针，覆盖组织，放入湿盒，在55 ℃孵育16~20 h。杂交后充分洗涤，并脱水晾干，最后进行显影拍照。

六、免疫组化染色

取10日龄野生型小鼠胫骨组织石蜡切片，行常规脱蜡复水后，浸入柠檬酸盐抗原修复液，煮沸继续加热2 min后自然冷却，随后在3% H_2O_2溶液中浸泡10 min以灭活内源性过氧化物酶，经BSA封闭30 min后，一抗4 ℃孵育过夜，复温，二抗室温孵育1h，DAB显色，苏木精复染及中性树脂封片。

七、TUNEL染色

取受精15.5天胎鼠（$Col10a1^{Cre/+}$; $Ptch1^{LacZ/C}$和$Col10a1^{Cre/+}$; $Ptch1^{LacZ/+}$）胫骨组织石蜡切片，经常规脱蜡复水后，按照TUNEL试剂盒说明书进行染色操作，最后于荧光显微镜下进行观察，对比分析肥大软骨细胞的凋亡水平。

八、影像学检查

将4周龄$Col10a1^{Cre/+}$; $Ihh^{null/C}$小鼠和$Col10a1^{Cre/+}$; $Ihh^{null/+}$小鼠麻醉并摆好姿势后，使用Senograph 600T Senix HF X线机对小鼠全身进行扫描，对比分析小鼠的骨骼发育状况。

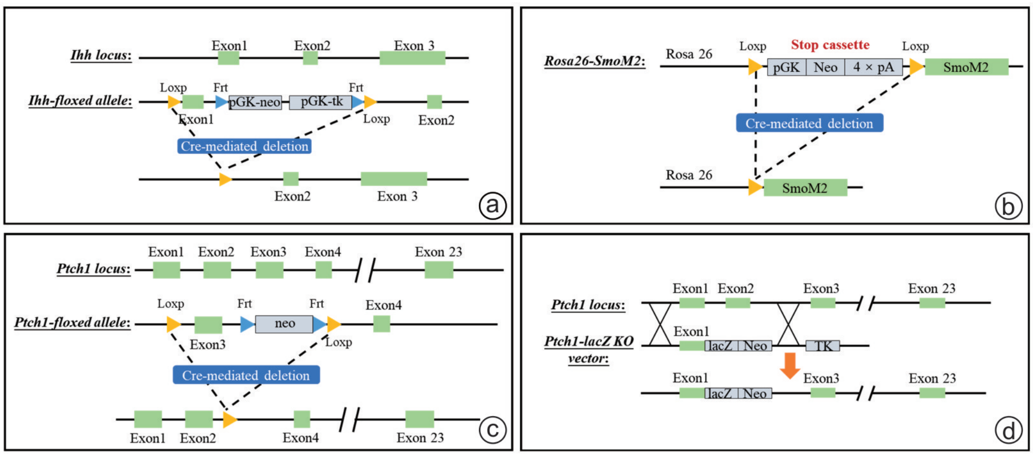

图1 基因修饰小鼠构建模式图 a~c：Cre重组酶驱动*Ihh-floxed*（a）、*Rosa26-SmoM2*（b）和*Ptch1-floxed*（c）等位基因发生重组；d：*Ptch1-lacZ*等位基因示意图

结 果

一、IHH信号通路相关分子的表达特征

我们用原位杂交和免疫组化的方法检测野生型小鼠出生后*Ihh*的表达特点,结果(图2)显示小鼠10日龄时,*Ihh*在肥大软骨细胞中大量表达,合成的IHH蛋白主要分布于细胞外基质内。肥大软骨细胞不表达*Ptch1*和*Gli1*,而其周围细胞,如软骨-骨交界及骨小梁区域的部分细胞则高表达*Ptch1*和*Gli1*。

二、抑制肥大软骨细胞合成IHH损害软骨内成骨过程

与对照组小鼠相比,$Col10a1^{Cre/+}$; $Ihh^{null/C}$小鼠在4周龄时呈现明显的短肢侏儒的表现(图3 a)。X线检查结果也显示该小鼠骨骼发育异常,表现为胸廓狭小、球形头骨及椎骨发育异常(图3 b)。股骨远端及胫骨近端明显的异常表现提示抑制肥大软骨细胞合成IHH蛋白可能损害软骨内骨化过程。

随后,我们通过阿利新蓝染色对10日龄$Col10a1^{Cre/+}$; $Ihh^{null/C}$小鼠胫骨近端组织进行分析后发现其生长板和骨小梁结构紊乱。并且在生长板下方出现一混杂着软骨和骨小梁组织的膨大区域(图4)。

三、IHH信号通路持续启动不影响肥大软骨细胞终末分化

为了验证$Col10a1^{Cre/+}$; $Ptch1^{LacZ/C}$小鼠是否构建成功,我们在受精15.5天胎鼠胫骨组织中采用原位杂交的方法检测*Cre*、*Ptch1-E3*和*Ptch1*等基因的表达水平。两端肥大区软骨之间为晚期肥大软骨细胞。*Cre* mRNA严格表达于肥大软骨细胞中,证明了基因敲除的特异性(图5 a、d)。晚期肥大软骨细胞截短的*Ptch1*表达上调证明基因敲除成功,IHH信号通路顺利启动(图5 b、c、e、f)。

胚胎15.5天时,$Col10a1^{Cre/+}$; $Ptch1^{LacZ/C}$小鼠的胫骨形态结构与对照组相似(图6 a、e)。而且与对照组相比,该小鼠的*Ihh*(preHCs和HCs的标志物)和*Col1a1*(成骨细胞的标志物)的表达特征均未发生改变(图6 b、c、f、g)。另外,肥大软骨细胞的凋亡水平也未发生改变(图6 d、h)。

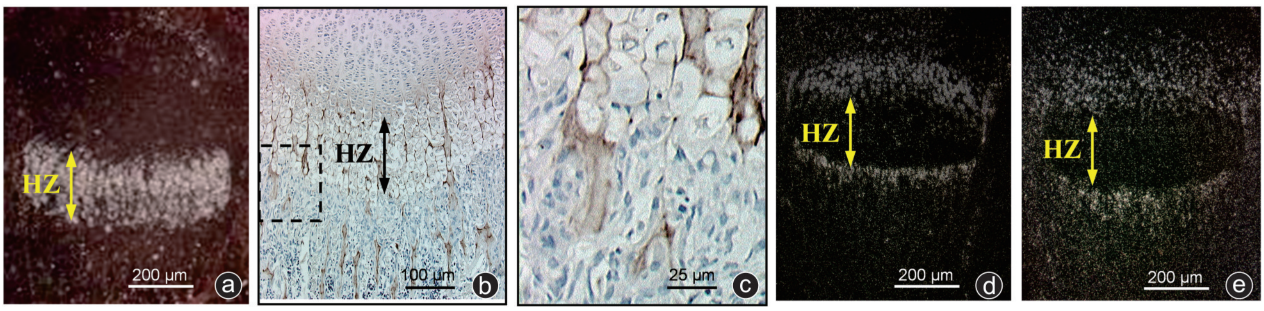

图2 10日龄野生型小鼠胫骨生长板区IHH信号通路相关分子的表达特征(HZ:生长板肥大层) a:*Ihh*的原位杂交结果;b、c:IHH蛋白的免疫组化结果,其中c为b中黑色框选区域的高倍图;d:*Ptch1*的原位杂交结果;e:*Gli1*的原位杂交结果

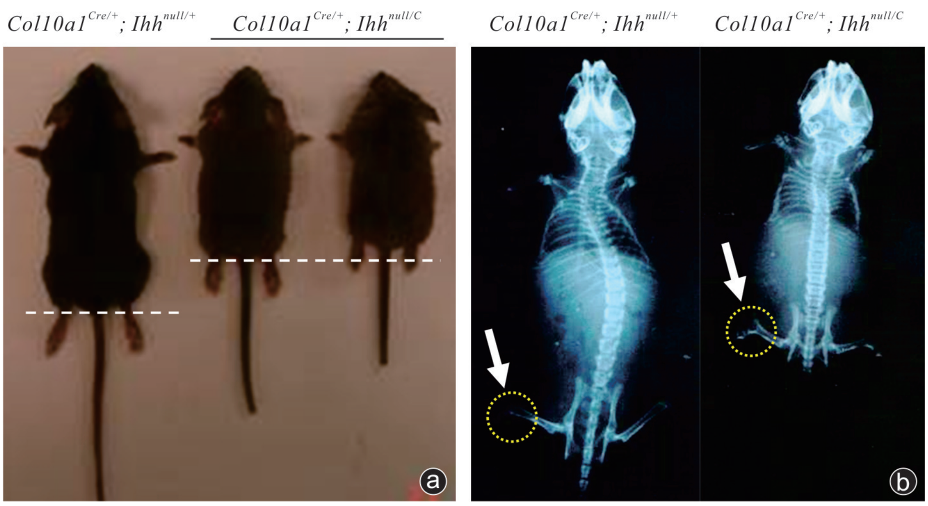

图3 抑制肥大软骨细胞合成IHH导致骨骼发育异常 a:4周龄$Col10a1^{Cre/+}$; $Ihh^{null/C}$小鼠与对照小鼠($Col10a1^{Cre/+}$; $Ihh^{null/+}$)的大体形态观察;b:4周龄$Col10a1^{Cre/+}$; $Ihh^{null/C}$小鼠与对照小鼠($Col10a1^{Cre/+}$; $Ihh^{null/+}$)全身X线扫描结果,箭头所指黄色圈选区域显示小鼠股骨远端和胫骨近端结构

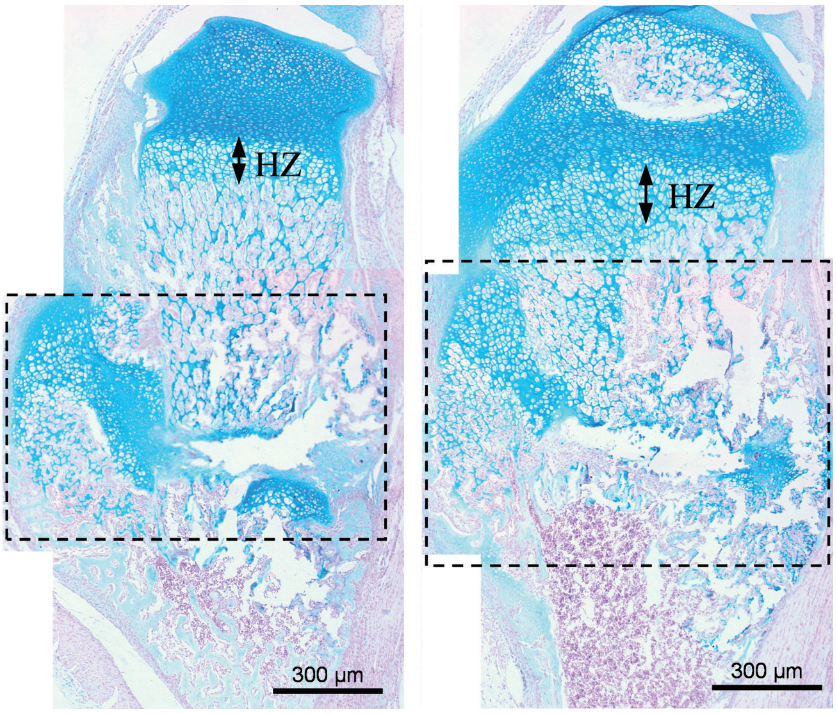

图4 10日龄 *Col10a1*$^{Cre/+}$;*Ihh*$^{null/C}$小鼠胫骨组织阿利新蓝染色结果显示软骨内成骨异常，黑色框选区域显示混杂着软骨组织与骨小梁组织的膨大区域

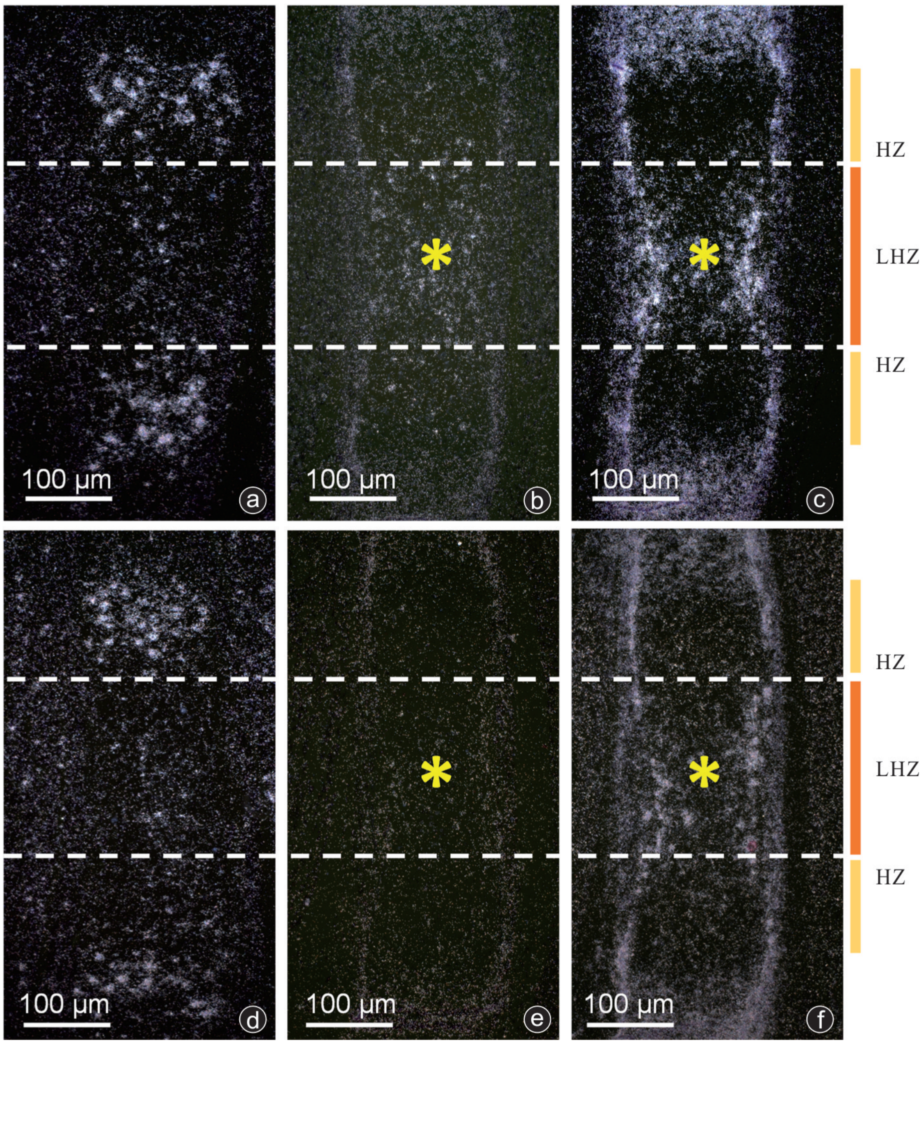

图5 *Col10a1*$^{Cre/+}$; *Ptch1*$^{LacZ/C}$小鼠模型的评估（LHZ：晚期肥大软骨区，即星号指示区域），胚胎15.5天，*Col10a1*$^{Cre/+}$; *Ptch1*$^{LacZ/C}$小鼠（a~c）与对照组（*Col10a1*$^{Cre/+}$; *Ptch1*$^{LacZ/+}$小鼠）（d~f）胫骨组织的*Cre*（a、d），*Ptch1-E3*（b、e）和*Ptch1*（c、f）的原位杂交结果

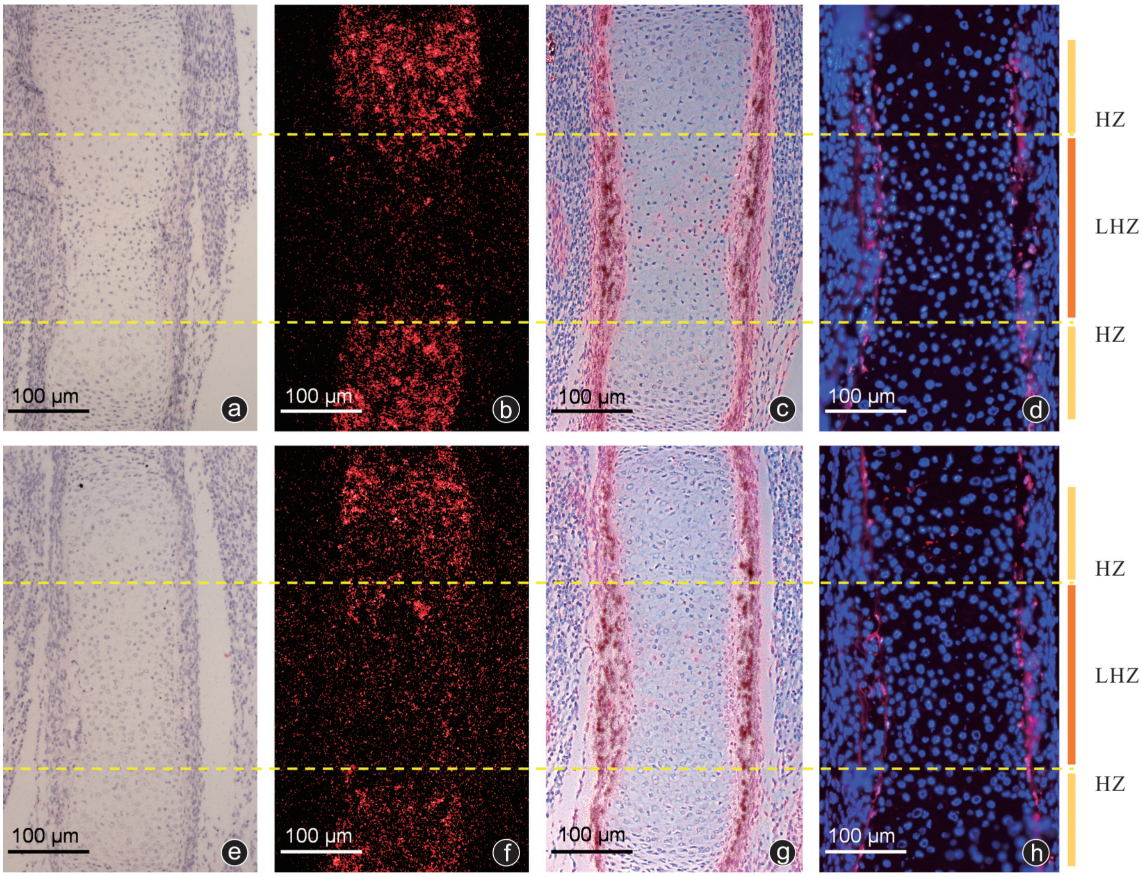

图6　IHH信号通路持续启动不影响软骨细胞终末分化：受精15.5天 $Col10a1^{Cre/+}$; $Ptch1^{LacZ/C}$ 胎鼠（a~d）与对照组（$Col10a1^{Cre/+}$; $Ptch1^{LacZ/+}$ 胎鼠）（e~h）胫骨组织的HE染色结果（a、e），*Ihh*（b、f）和*Col1a1*（c、g）的原位杂交结果以及TUNEL染色结果（d、h）

四、IHH信号通路持续启动导致出生后骨骼发育异常

虽然肥大软骨细胞中IHH信号通路启动的小鼠在胚胎15.5天时未出现异常表现，但是我们对出生后的 $Col10a1^{Cre/+}$; $R26Smo^{M2/M2}$ 小鼠胫骨进行组织学分析时发现除骨小梁结构发生轻微改变外，骨内膜以及皮质骨均出现了明显的发育异常；与对照组小鼠相比，该小鼠皮质骨厚度下降，而且在骨内膜上发现了一些异常聚集的细胞，细胞形态相似，体积较大，细胞核较大，而且排列拥挤、无序，具有肿瘤细胞的一般特征（图7）。

讨　论

近年来，软骨内成骨过程中肥大软骨细胞的分化方向一直是研究热点。细胞谱系追踪研究已经证实肥大软骨细胞是成骨细胞的另一来源并参与骨形成[3,5-6]，逐渐改变了凋亡是肥大软骨细胞最终归宿这一固有认识。然而肥大软骨细胞转分化过程的重要意义与潜在的调控机制仍有待阐明。鉴于IHH信号通路在骨软骨生长发育中发挥了关键的调控作用，我们推测该通路可能对软骨细胞转分化过程具有调控功能。本研究通过构建基因修饰小鼠，特异性地调节肥大软骨细胞及其子代细胞中的IHH信号通路的活性，探究IHH信号通路在软骨细胞成熟以及转分化过程的调控作用。

一、肥大软骨细胞分泌的IHH蛋白对软骨内骨化过程具有关键调控功能

首先我们明确了IHH信号通路相关分子在软骨内骨化过程中的表达特征，IHH在胚胎早期阶段主要由前肥大软骨细胞表达[21]。我们在10日龄野生型小鼠胫骨生长板区域观察到肥大软骨细胞也能够合成分泌IHH蛋白，但却不表达*Ptch1*和*Gli1*。*Ptch1*和*Gli1*均是IHH信号通路的下游靶基因，能够显示该通路的启动状态。这一结果表明肥大软骨细胞不是IHH蛋白的响应细胞，可能不接受IHH信号通路的调控。然而不可忽视的是，临近肥大区软骨的软骨-骨交界及骨小梁区域的部分细胞高表达*Ptch1*和*Gli1*，因此我们推测肥大软骨细胞分泌的IHH蛋白以旁分泌的形式影响周围细胞IHH信号通路的活性，从而参与调控软骨内骨化过程。

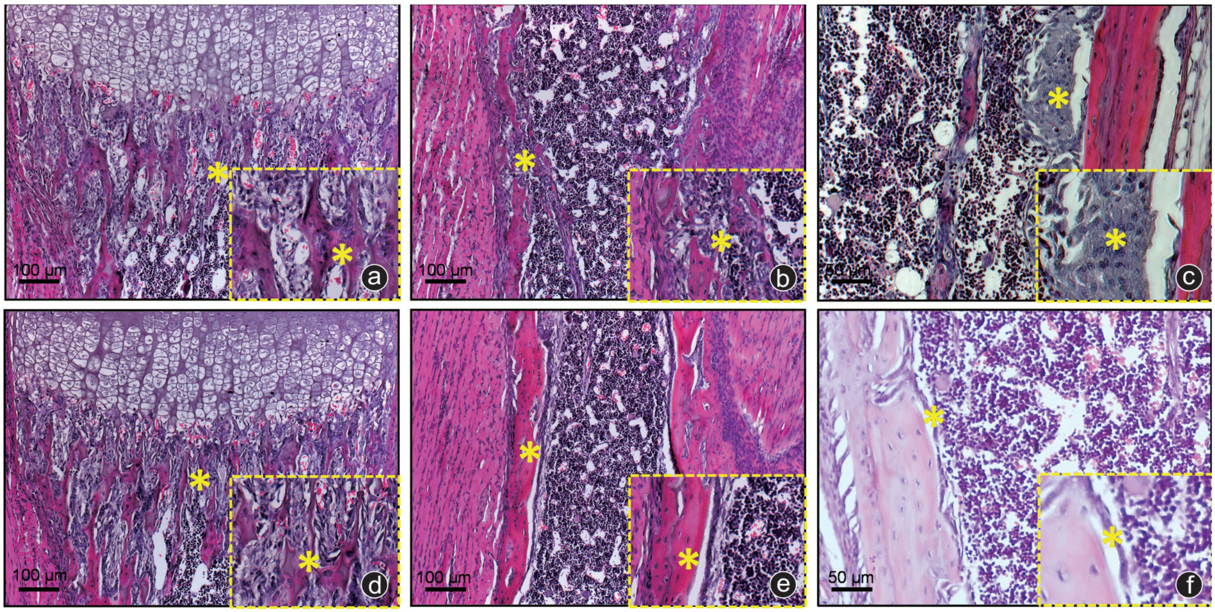

图7 *Col10a1*$^{Cre/+}$; *R26Smo*$^{M2/M2}$小鼠出生后骨骼发育异常，10日龄*Col10a1*$^{Cre/+}$; *R26Smo*$^{M2/M2}$小鼠（a~c）和对照组（*Col10a1*$^{Cre/+}$小鼠）（d~f）胫骨组织的HE染色结果，星号指示小鼠骨小梁（a、d），皮质骨（b、e）和骨内膜（c、f）的结构，黄色框选区域为星号指示区域的高倍图像

随后，我们构建了肥大软骨细胞特异性*Ihh*基因敲除小鼠，以探究肥大软骨细胞分泌的IHH蛋白的具体功能。我们观察到在敲除*Ihh*基因后，小鼠出现了明显的骨骼发育异常，进一步证实来源于肥大软骨细胞的IHH蛋白对胚胎晚期以及出生后小鼠的软骨内骨化过程具有关键的调控功能。

二、IHH信号通路不参与调控软骨细胞终末分化但对其转分化过程具有重要调控作用

为探究IHH信号通路对肥大软骨细胞成熟分化的影响，我们构建了两种基因修饰小鼠（*Col10a1*$^{Cre/+}$; *R26Smo*$^{M2/M2}$小鼠和*Col10a1*$^{Cre/+}$; *Ptch1*$^{LacZ/C}$小鼠），持续启动肥大软骨细胞及其子代细胞中的IHH信号通路。前期研究中我们发现在胚胎15.5天时，表达*Col10a1*的肥大区软骨之间存在着*Col10a1*表达显著下调、主要表达*Mmp13*的一群肥大软骨细胞[3]。这群细胞是肥大软骨细胞的终末分化阶段，在软骨内骨化过程中能够进一步分化成为成骨细胞，我们将其定义为晚期肥大软骨细胞[3]。结果显示，持续启动IHH信号通路后胎鼠胫骨组织的形态结构、肥大软骨细胞和成骨细胞的标志物以及肥大软骨细胞的凋亡水平均未发生明显变化。这些结果再次证实肥大软骨细胞不接受IHH信号通路的调控，IHH信号通路不参与调控软骨细胞的终末分化过程。然而出生后小鼠骨小梁、皮质骨以及骨内膜结构的显著异常则表明持续启动的IHH信号通路会影响软骨细胞的转分化，损害软骨内骨化过程。

三、持续启动IHH信号通路促进肿瘤形成

当肥大软骨细胞中的IHH信号通路持续启动时，我们在出生后小鼠胫骨骨内膜区域观察到一群异常聚集的细胞，这些细胞形态相似，体积较大，细胞核较大，而且排列拥挤、无序，具有肿瘤细胞的一般特征。据此，我们初步推测骨内膜上的细胞团可能是肿瘤组织。与之相符的是，IHH信号通路具有促进细胞增殖、抑制细胞凋亡以及促进肿瘤发生的功能作用。在软骨内骨化过程中，该通路能够直接促进生长板软骨细胞不断增殖从而维持生长板长度[21]。除此之外，IHH信号通路能够通过调节细胞周期因子发挥致癌作用[22-23]。先前的研究表明抑制PTCH1或者持续启动SMO均会导致与IHH信号通路相关的肿瘤发生过程[24]。因此我们推测骨内膜上异常的细胞团是肥大软骨细胞的子代细胞在IHH信号通路持续刺激下异常增殖的结果。

骨肿瘤是比较常见的原发性骨骼病变，其中包括良性肿瘤以及恶性的骨软骨肉瘤[25-26]。近期，研究人员利用间充质干细胞、软骨细胞和成骨细胞特异性基因修饰小鼠对骨肿瘤的细胞来源进行了相应的研究。在*Prx1*$^{+}$间充质干细胞中敲除*Ptch1*基因后会导致内生软骨瘤及骨肉瘤的发生[23]；在*Ctsk*$^{+}$间充质干细胞中敲除*Ptpn11*也会导致内生软骨瘤的发生[27]；在表达*Col2a1*的软骨细胞中抑制FGFR3和LKB1的活性会导致临近生长板的软骨肿瘤[28-29]；分别在表达*Osterix*和*Col1a1*的成骨细胞中沉默*p53*和

*Rb*基因则会导致骨肉瘤的发生[30-32]。耐人寻味的是,我们的研究也发现在晚期肥大软骨细胞中持续启动IHH信号通路会导致具有肿瘤细胞特征的细胞团出现。这表明软骨细胞转分化过程的异常调控具有一定的病理学意义,而晚期肥大软骨细胞可能是某些骨肿瘤形成的前体细胞。

综上所述,IHH信号通路在软骨内骨化过程中具有不可或缺的功能作用。虽然该通路不参与调控肥大软骨细胞的终末分化,但其在软骨细胞的转分化过程中具有重要的调控作用。

参 考 文 献

[1] Silva Barreto I, Le Cann S, Ahmed S, et al. Multiscale characterization of embryonic long bone mineralization in mice[J]. Adv Sci (Weinh), 2020, 7(21): 2002524.

[2] Cheung JO, Grant ME, Jones CJ, et al. Apoptosis of terminal hypertrophic chondrocytes in an in vitro model of endochondral ossification[J]. J Pathol, 2003, 201(3): 496-503.

[3] Yang L, Tsang KY, Tang HC, et al. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(33): 12097-12102.

[4] Tsang KY, Cheah KS. The extended chondrocyte lineage: implications for skeletal homeostasis and disorders[J]. Curr Opin Cell Biol, 2019, 61: 132-140.

[5] Yang G, Zhu L, Hou N, et al. Osteogenic fate of hypertrophic chondrocytes[J]. Cell Res, 2014, 24(10): 1266-1269.

[6] Enishi T, Yukata K, Takahashi M, et al. Hypertrophic chondrocytes in the rabbit growth plate can proliferate and differentiate into osteogenic cells when capillary invasion is interposed by a membrane filter[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104638.

[7] Tan Z, Kong M, Wen S, et al. IRX3 and IRX5 inhibit adipogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes and promote osteogenesis[J]. J Bone Miner Res, 2020, 35(12): 2444-2457.

[8] Jing Y, Jing J, Wang K, et al. Vital roles of beta-catenin in trans-differentiation of chondrocytes to bone cells[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(1): 1-9.

[9] Houben A, Kostanova-Poliakova D, Weissenbock M, et al. beta-catenin activity in late hypertrophic chondrocytes locally orchestrates osteoblastogenesis and osteoclastogenesis[J]. Development, 2016, 143(20): 3826-3838.

[10] Alman BA. The role of hedgehog signalling in skeletal health and disease[J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11(9): 552-560.

[11] Ohba S. Hedgehog signaling in skeletal development: Roles of indian hedgehog and the mode of its action[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18).

[12] Ho EK, Stearns T. Hedgehog signaling and the primary cilium: implications for spatial and temporal constraints on signaling[J]. Development, 2021, 148(9): dev195552.

[13] Williams JN, Kambrath AV, Patel RB, et al. Inhibition of CaMKK2 enhances fracture healing by stimulating indian hedgehog signaling and accelerating endochondral ossification[J]. J Bone Miner Res, 2018, 33(5): 930-944.

[14] Kobayashi T, Soegiarto DW, Yang Y, et al. Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP[J]. J Clin Invest, 2005, 115(7): 1734-1742.

[15] Long F, Chung UI, Ohba S, et al. Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton[J]. Development, 2004, 131(6): 1309-1318.

[16] Mao J, Ligon KL, Rakhlin EY, et al. A novel somatic mouse model to survey tumorigenic potential applied to the Hedgehog pathway[J]. Cancer Res, 2006, 66(20): 10171-10178.

[17] Razzaque MS, Soegiarto DW, Chang D, et al. Conditional deletion of Indian hedgehog from collagen type 2alpha1-expressing cells results in abnormal endochondral bone formation[J]. J Pathol, 2005, 207(4): 453-461.

[18] Lewandoski M, Martin GR. Cre-mediated chromosome loss in mice[J]. Nat Genet, 1997, 17(2): 223-225.

[19] Ellis T, Smyth I, Riley E, et al. Patched 1 conditional null allele in mice[J]. Genesis, 2003, 36(3): 158-161.

[20] Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, et al. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants[J]. Science, 1997, 277(5329): 1109-1113.

[21] St-Jacques B, Hammerschmidt M, Mcmahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation[J]. Genes Dev, 1999, 13(16): 2072-2086.

[22] Raleigh DR, Reiter JF. Misactivation of Hedgehog signaling causes inherited and sporadic cancers[J]. J Clin Invest, 2019, 129(2): 465-475.

[23] Deng Q, Li P, Che M, et al. Activation of hedgehog signaling in mesenchymal stem cells induces cartilage and bone tumor formation via Wnt/beta-Catenin[J]. Elife, 2019,8: e50208.

[24] Sigafoos AN, Paradise BD, Fernandez-Zapico ME. Hedgehog/GLI signaling pathway: transduction, regulation, and implications for disease[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(14): 3410 .

[25] Kansara M, Teng MW, Smyth MJ, et al. Translational biology of osteosarcoma[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(11): 722-735.

[26] Bovee JV, Hogendoorn PC, Wunder JS, et al. Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets[J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(7): 481-488.

[27] Yang W, Wang J, Moore DC, et al. Ptpn11 deletion in a novel progenitor causes metachondromatosis by inducing hedgehog signalling[J]. Nature, 2013, 499(7459): 491-495.

[28] Zhou S, Xie Y, Tang J, et al. FGFR3 deficiency causes multiple chondroma-like lesions by upregulating hedgehog signaling[J]. PLoS Genet, 2015, 11(6): e1005214.

[29] Lai LP, Lilley BN, Sanes JR, et al. Lkb1/Stk11 regulation of mTOR signaling controls the transition of chondrocyte fates and suppresses skeletal tumor formation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(48): 19450-19455.

[30] Walkley CR, Qudsi R, Sankaran VG, et al. Conditional mouse osteosarcoma, dependent on p53 loss and potentiated by loss of Rb, mimics the human disease[J]. Genes Dev, 2008, 22(12): 1662-1676.

[31] Calo E, Quintero-Estades JA, Danielian PS, et al. Rb regulates fate choice and lineage commitment in vivo[J]. Nature, 2010, 466(7310): 1110-1114.

[32] Del MS, Husanie H, Iancu O, et al. WWOX and p53 dysregulation synergize to drive the development of osteosarcoma[J]. Cancer Res, 2016, 76(20): 6107-6117.

(收稿日期: 2021-08-27)
(本文编辑:陈姗姗)

引用格式

王欢博, 贺婷, 郑超, 等. Indian Hedgehog信号通路在软骨细胞成熟及转分化过程中的调控作用[J]. 骨科, 2021, 12(6): 485-492. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2021.06.001.