论著

文章编号:1000-5404(2005)12-1220-03

小鼠胫骨骨折愈合中 FGFR3 基因表达的原位定位

杨启红[1],陈 林[1],朱京慈[2] (第三军医大学:[1] 大坪医院野战外科研究所创伤中心实验室,重庆 400042,[2] 护理系,重庆 400038)

提 要:目的 观察成纤维细胞生长因子受体 3(FGFR3)基因在小鼠胫骨骨折愈合中的时空表达模式,分析 FGFR3 在骨折愈合中可能的作用。**方法** 选用标准的小鼠胫骨骨折模型,常规石蜡切片,观察 FGFR3 mRNA 在骨折愈合过程中不同时期的基因表达情况。**结果** 骨折后软骨痂中前软骨细胞中出现微弱的 FGFR3 mRNA 信号。至 7 d,骨痂肥大前软骨细胞和肥大软骨细胞中均可见 FGFR3 mRNA 强阳性表达。到 14 d 和 28 d,骨痂软骨细胞被成骨细胞取代,FGFR3 阳性表达信号消失。**结论** FGFR3 在小鼠胫骨骨折愈合中的肥大前软骨细胞和肥大软骨细胞中表达,提示参与调节胚胎骨骼发育中软骨细胞增殖的 FGFR3 基因,可能在成年骨折愈合中参与调节了软骨细胞的分化而影响骨折愈合。

关键词: FGFR3;软骨内骨化;骨折;原位杂交;基因表达

中图法分类号: R364.3; R394.2; R683.42 **文献标识码:** A

Expression of fibroblast growth factor receptor-3 during fracture healing

YANG Qi-hong[1], CHEN Lin[1], ZHU Jing-ci[2] ([1]Laboratory of Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, [2]Nursing Faculty, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the spatial and temporal expression patterns of FGFR3 gene and analyze the potential roles of FGFR3 during fracture healing and explore the technique of *in situ* hybridization of paraffin sections of bone tissue. **Methods** The fracture model of mouse tibia was established by the standard methods. The expression of FGFR3 mRNA was studied by *in situ* hybridization during the various stages of bone repair. **Results** There was faint FGFR3 positive-signal in the cytoplasm of prehypertrophic chondrocytes in soft callus on day 5. FGFR3 mRNA was strongly expressed in prehypertrophic chondrocytes and hypertrophic chondrocytes in soft callus on day 7, but disappeared on day 14, 28 because chondrocytes was replaced by osteoblasts. **Conclusion** FGFR3 mRNA was strongly expressed in prehypertrophic chondrocytes and hypertrophic chondrocytes in the fracture callus, which shows that FGFR3, a gene that regulates the proliferation of chondrocytes during bone development, may participate in the regulation of differentiation of chondrocytes during fracture healing.

Key words: FGFR3; endochondral ossification; fracture; *in situ* hybridization; gene expression

骨折愈合是一个复杂的修复过程,涉及两种不同的方式:即膜内骨化和软骨内骨化,二者同时还参与胚胎骨骼发育[1]。大量研究表明,参与调节胚胎骨骼发育的许多信号分子,如:FGFs、TGF-β、BMPs 等同时也参与调节成年骨折愈合。成纤维细胞生长因子受体(FGFRs)是一类具有自身磷酸化活性的跨膜酪氨酸激酶受体,目前已发现的共有 4 种 FGFRs,即 FGFR1、FGFR2、FGFR3 和 FGFR4,分别由 4 个独立的基因 flg、bek、fgfr3 和 flg-2 编码。FGFs /FGFRs 信号在细胞的增殖、分化、血管生成、骨骼形成、伤口愈合和生长发育等过程中起着十分重要的作用。FGFR3 是长骨生长的负性调节因子[2],参与调节胚胎骨骼发育的软骨内骨化过程,影响软骨细胞的增殖。由于骨折愈合的软骨内骨化与骨骼发育极其相似,而有关 FGFR3 与骨折愈合之间关系的研究目前尚不多见,故本实验通过应用原位杂交组织化学技术检测 FGFR3 mRNA 在骨折骨痂成熟过程中的时空变化情况,从而探讨 FGFR3 在骨折愈合过程中可能的作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立

野生型雄性昆明白小鼠 25 只,6 ~ 8 周龄,体质量 22 ~ 28 g

基金项目: 国家自然科学基金杰出青年基金资助项目(30425023);重庆市自然科学基金资助项目(2004)
Supported by the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (30425023) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2004)

作者简介: 杨启红(1974 -),女,云南省昆明市人,硕士,助教,主要从事骨折创伤机制和护理方面的研究。电话:(023)66765585

收稿日期: 2004-04-15;**修回日期:** 2004-09-15

（由大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供）。2.5% Avertin（0.012～0.018 ml/g）行腹腔内注射麻醉，采用标准的小鼠胫骨骨折模型[3,4]。具体操作如下：于左侧下肢膝关节处脱毛、消毒，纵向剪开皮肤，暴露并剥离膝关节韧带，在胫骨髁间处钻孔，沿髓腔方向插入直径约为 0.25 mm 的无菌克氏钢针。在胫骨中上 1/3 处钝性剥离肌肉筋膜，横向折断胫骨。无菌 PBS 冲洗，逐层关闭切口。小鼠单笼饲养，室温 22～24 ℃，提供标准饲料，自由饮食饮水及自由活动。分别在骨折术后 3、5、7、14 d 和 28 d 5 个时相点（每组 5 只）以颈椎脱臼法处死动物，取材。

1.2　X 线摄片

骨折小鼠术后每周定期行 X 线摄片检查，了解骨折及其愈合情况。

1.3　组织处理

处死小鼠后，剪开左下肢皮肤后暴露膝关节及胫骨，抽出内固定钢针。于骨折断端上下约 0.5 cm 处剪断胫骨，用 PBS 漂洗数次后，置于 4% 多聚甲醛中，0 ℃固定 24 h。PBS 漂洗后用 15% EDTA（pH 7.6）脱钙，常规石蜡包埋、切片（6 μm）。HE 染色，光镜下观察。

1.4　探针准备

小鼠 FGFR3 cDNA 片段质粒由美国 NIH 馈赠，作为检测其 mRNA 的探针。采用地高辛标记试剂盒（ROCHE 公司，德国），按试剂盒操作步骤用随机引物法标记探针。标记好的探针经乙醇沉淀纯化，稀释成 25 μg/ml，分装后置于 -70 ℃保存备用。

1.5　原位杂交

石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后，室温下用 4% 多聚甲醛液去蛋白 20 min。然后依次经甘氨酸处理、蛋白酶 K（20 μg/ml）37 ℃消化 20～30 min、乙酸酐酸化 10 min。每一步骤间切片均用 PBST 漂洗 3 min。切片在含有探针（浓度为 1 μg/ml）的杂交液中 56 ℃孵育 16～20 h。杂交缓冲液由 2×SSC，50% 甲酰胺，5×Denhart's 液，0.01 mg/ml 变性鲑精 DNA 和 2.5% 硫酸葡聚糖组成。杂交后的切片在 70 ℃的 5×SSC 液中孵育 30 min，直至盖片浮起。充分漂洗后，在阻断试剂（ROCHE 公司，德国）中孵育 1 h。检测结果依照地高辛标记试剂盒说明采用碱性磷酸酶-抗地高辛抗体（1∶5 000）孵育，NBT/BCIP 显色，甲基绿复染。杂交缓冲液中不加探针作为杂交反应的阴性对照；而检测体系中用 PBST 代替地高辛抗体作为检测反应的阴性对照。结果判定，胞浆中出现蓝紫色颗粒物质为阳性细胞。

2　结果

本实验采用标准的小鼠胫骨骨折模型，应用 X 线摄片及 HE 染色观察骨折愈合的进程及组织形态学变化特征。此外，应用原位杂交技术检测 FGFR3 mRNA 在骨折愈合过程中的时空表达。

2.1　X 线摄片及组织学观察

X 线摄片可见（图 1），骨折后 7 d，骨折线清晰；到 14 d，骨折线变模糊，骨痂阴影明显扩大，但密度不高；而 21 d 时骨痂密度明显增高；28 d 则骨折线消失，局部骨痂阴影缩小，骨折端连接。组织学上，骨折后 3 d，小鼠骨折局部血肿机化，成纤维细胞、毛细血管芽长入血凝块，形成肉芽组织。5 d，骨折端附近的局部骨膜增厚，密集的间充质细胞增殖并直接分化成成骨细胞。而位于骨折端间隙处肉芽组织中的间充质细胞则分化成软骨细胞。到 7 d 时，骨痂增大，主要由未成熟和成熟的软骨细胞组成，而且骨折处皮质骨附近的软骨细胞明显肥大，局部还出现大量新生的骨小梁，其外周可见成骨细胞。骨痂在 14 d 时达到最大，内部肥大的软骨细胞被成骨细胞取代，镜下可见大量新生的编织骨。骨小梁变粗大，形成骨髓腔，可见较成熟的骨组织。28 d，骨折端形成骨性连接，硬骨痂在功能活跃的破骨细胞作用下被大量吸收，骨折愈合进入全面重建。



A：7 d；B：14 d；C：21 d；D：28 d

图 1　小鼠胫骨骨折后不同时期的 X 线表现

Fig 1　Radiographs during tibia fracture healing in mice

2.2　原位杂交组织化学观察

骨折后 3 d，骨折端肉芽组织中几乎没有 FGFR3 阳性表达的细胞。5 d 时，软骨痂肥大前软骨细胞中有微弱的 FGFR3 mRNA 信号显示（图 2）。至骨折后 7 d，软骨痂中的软骨细胞不断分化，在肥大前软骨细胞和肥大软骨细胞中可见 FGFR3 mRNA 强阳性表达（图 3）。到骨折愈合的中后期（即骨折后 14 d 和 28 d），软骨痂中的肥大软骨细胞被成骨细胞取代，此时 FGFR3 阳性表达信号消失。整个小鼠胫骨骨折愈合过程中，在硬骨痂细胞中均未检出 FGFR3 阳性表达信号。

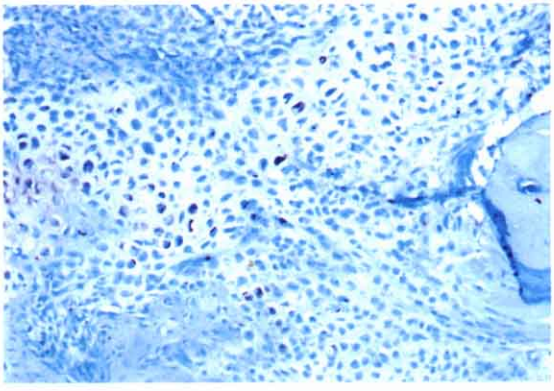


图 2　小鼠骨折愈合第 5 天骨痂 FGFR3 基因表达上调　（原位杂交×100）

Fig 2　The up-regulated gene expression of FGFR3 in callus in mice on day 5　（ISH×100）

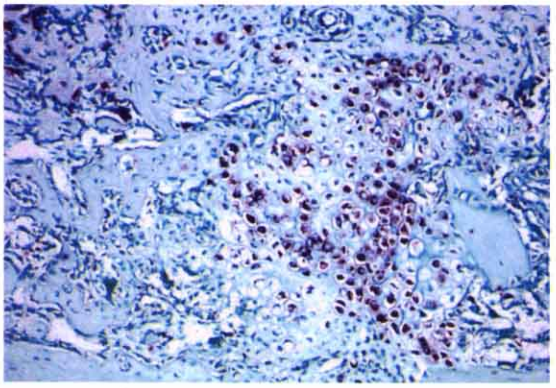


图 3 小鼠骨折愈合第 7 天骨痂 FGFR3 基因表达明显上调 （原位杂交 × 100）

Fig 3 The up-regulated gene expression of FGFR3 in callus in mice on day 7 （ISH × 100）

3 讨论

骨折愈合是骨组织完全性再生，而非纤维瘢痕修复。骨折愈合的组织学过程包括血肿、炎症、骨膜反应、软骨形成、软骨内骨化和骨重建等阶段。本实验的组织形态学观察结果与上述组织学过程一致。

骨折愈合这一修复过程与胚胎骨骼发育过程极为相似，且大量研究表明参与调节胚胎骨骼发育的多种生长因子，如：IGFs、PDGFs、TGF-β 和 FGFs 等家族成员，不仅在骨折愈合过程中出现，并且还调节着骨折愈合过程[1]。目前已知，FGFR3 是一种具有调节发育等功能的跨膜蛋白质，属酪氨酸激酶受体家族。大量研究认为，FGFR3 是软骨增殖的负性调节因子，且 FGFR3 介导的软骨增殖抑制是长骨维持自身发育稳定的必需条件[5-7]。Rundle 等[8]发现，在骨折愈合的不同阶段，FGFR1、2、3 在骨折处的增生性间充质细胞、软骨细胞和成骨细胞等处表达，且 FGFR3 在软骨内骨化过程中持续表达，提示 FGFR3 在骨折愈合中具有重要作用。Nakajima 等[9]应用大鼠股骨闭合性骨折愈合模型研究发现，FGFR3 在骨痂肥大前软骨细胞中高表达，且 FGFR3 与 STAT-1、P21 在骨折愈合中表现出极为相似的时空表达模式，提示在骨折愈合中 FGFR3 参与调节软骨细胞的分化，其信号由 STAT-1 和 P21 介导，通过诱导软骨细胞凋亡，从而促进软骨内骨化。

本研究结果与上述研究基本一致。我们应用原位杂交组织化学技术检测 FGFR3 mRNA 在骨折愈合过程中的时空表达情况，结果显示，FGFR3 mRNA 的表达模式在骨骼发育和骨折愈合中并不完全相同，但 FGFR3 在二者共有的软骨内骨化中均明显表达。骨骼发育中，FGFR3 mRNA 在静息和增殖软骨细胞中强烈表达[2,8]。而骨折愈合中，FGFR3 mRNA 主要在软骨痂的肥大前和肥大软骨细胞中表达，但在增殖软骨细胞中却几乎不表达。因此，我们认为，FGFR3 这个重要的发育调节因子在骨折愈合中同样具有调节作用，但表达模式上的差异则说明，FGFR3 在成年骨折愈合中的作用很有可能不再是调节软骨细胞的增殖而是调节软骨细胞的分化，但有关 FGFR3 及其下游信号的确切作用机制仍需进一步深入研究。

值得一提的是，Rundle 等的模型中，FGFR3 mRNA 在软骨细胞中的时空表达模式与我们在成年小鼠胫骨骨折模型中获得的结果在时间进程上并不完全相同。他们在骨折后 14 d 仍可检出肥大前软骨细胞的 FGFR3 阳性信号。而我们的研究则发现，骨折后 14 d 由于骨完全取代软骨，骨痂中的 FGFR3 表达完全消失。二者在时间进程上的差异，其原因可能是 Rundle 等应用的是 7 周龄 SD 大鼠股骨骨折愈合模型，故骨连接发生相对较慢；而我们选用的是 6～8 周龄的昆明白小鼠胫骨骨折愈合模型，且运用了克氏钢针起内固定作用，因而骨连接发生相对较快。

总之，骨折愈合是一个复杂的病理过程，FGFR3 在此过程中的变化可能受许多系统和/或局部因素的调节，对这些过程的认识将有助于我们对骨愈合机制的理解。

参考文献：

[1] Ferguson C, Alpern E, Miclau T, *et al*. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation[J]? Mech Dev, 1999, 87(1-2): 57－66.

[2] Deng C, Wynshaw Boris A, Zhou F, *et al*. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth[J]. Cell, 1996, 84(6): 911－921.

[3] Le A X, Miclau T, Hu D, *et al*. Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures[J]. J Orthop Res, 2001, 19(1): 78－84.

[4] Bourque W T, Gross M, Hall B K. A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair[J]. Lab Anim Sci, 1992, 42(4): 369－374.

[5] Wang Y, Spatz M K, Kannan K, *et al*. A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(8): 4455－4460.

[6] Chen L, Adar R, Yang X, *et al*. Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis [J]. J Clin Invest, 1999, 104(11): 1517－1525.

[7] Segev O, Chumakov I, Nevo Z, *et al*. Restrained chondrocyte proliferation and maturation with abnormal growth plate vascularization and ossification in human FGFR-3(G380R) transgenic mice[J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(2): 249－258.

[8] Rundle C H, Miyakoshi N, Ramirez E, *et al*. Expression of the fibroblast growth factor receptor genes in fracture repair[J]. Clin Orthop, 2002, (403): 253－263.

[9] Nakajima A, Shimizu S, Moriya H, *et al*. Expression of fibroblast growth factor receptor-3 (FGFR3), signal transducer and activator of transcription-1, and cyclin-dependent kinase inhibitor p21 during endochondral ossification: differential role of FGFR3 in skeletal development and fracture repair [J]. Endocrinology, 2003, 144(10): 4659－4668.

（编辑 栾 嘉）