论著

文章编号:1000-5404(2011)10-1024-04

小鼠胫骨骨皮质损伤修复过程中成纤维生长因子受体的表达

周 锐,苏 楠,李 灿,陈思宇,谢杨丽,陈 林 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤实验室,骨代谢修复中心,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

【摘要】 **目的** 观察小鼠胫骨骨皮质损伤修复过程中成纤维生长因子受体(fibroblast growth factor receptors,FGFRs)的表达变化。**方法** 通过建立小鼠胫骨骨皮质损伤模型,在组织学水平观察皮质损伤后愈合情况,同时提取损伤后3、7、14、21 d 4个时相点损伤部位新生骨痂组织RNA,采用定量PCR检测FGFRs及骨形成标记分子核结合因子al(Cbfa1)、骨钙素(OC)、骨桥蛋白(OP)等mRNA的动态表达谱。**结果** 骨皮质损伤后第7天,小鼠骨髓腔有新生骨组织出现,到第21天,皮质骨缺损处出现新的板层骨结构。Cbfa1、OP的mRNA表达水平在骨皮质损伤后早期即迅速升高,OC则在修复阶段中后期表达升高。FGFR1、2在损伤后迅速升高,于第3天达到峰值(2.09±0.25,1.82±0.15,$P<0.01$),然后逐渐回落;FGFR3于损伤后7 d达到峰值(3.61±0.52,$P<0.01$).14 d稍有回落,在第21天时则又显著升高($P<0.01$)。**结论** 伴随着骨皮质损伤后成骨细胞分化标记基因的表达升高,FGFR1、2、3的mRNA表达水平在皮质损伤后早期即显著升高,并持续高表达到愈合晚期阶段。提示FGFRs参与调节骨皮质损伤后的骨再生过程。

【关键词】 成纤维生长因子受体;骨皮质损伤;骨再生

【中图法分类号】 R683.02;R341;R394.3 【文献标志码】 A

Expression profile of fibroblast growth factor receptors during tibial cortical defect repair in mice

Zhou Rui, Su Nan, Li Can, Chen Siyu, Xie Yangli, Chen Lin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

【**Abstract**】 **Objective** To determine the expressions of fibroblast growth factor receptors (FGFRs) during tibial cortical defect repair in mice. **Methods** Cortical defect was inflicted in C57BL/6J mice tibiae. The healing process was observed histologically on 7, 14, and 21 d after injury with HE staining. Total RNA of the injury site was extracted in 3, 7, 14, and 21 d after injury ($n=4$ for each time point), and then quantitative RT-PCR was employed to evaluate the mRNA temporal expression patterns of FGFRs and bone formation molecular markers during healing process. **Results** Consistent with prior reports, newly regenerated bone appeared in the marrow area at day 7 after injury. At day 21, a lamellar bone appeared at cortical bone region. The mRNA expression levels of Cbfa1 and osteopontin (OP) were up-regulated rapidly at early stage post-injury, Osteocalcin (OC) expression was also increased at later stage. FGFR1,2 expression peaking at day 3 after injury(FGFR1 2.09±0.25,FGFR2 1.82±0.15,$P<0.01$);FGFR3 expression peaked at day 7(3.61±0.52,$P<0.01$),then decreased slightly at day 14 and was markedly up-regulated at day 21($P<0.01$). **Conclusion** Coincident with the increase of the bone markers, FGFR1, 2, and 3 are significantly up-regulated at the early stage post-injury, and highly expressed during the healing process. FGFRs participate in the bone regeneration process after cortical defect.

【**Key words**】 fibroblast growth factor receptors, cortical bone defect, bone regeneration

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2005CB522604) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars (30301527). Corresponding author: Chen Lin, Tel: 86-23-68757041, E-mail: linchen70@163.com

骨的再生修复是局部骨骼的再发育过程。许多参与调控骨骼发育的分子如IHH/PTHrP、成纤维生长因子(FGFs)、骨形态发生蛋白(BMPs)、Wnt等在骨再生过程中也发挥着重要作用[1-2]。成纤维生长因子受体(fibroblast growth factor receptors,FGFRs)属于酪氨酸蛋白激酶受体家族,参与调节骨骼发育过程中的多种细胞事件(cellular events),与骨骼发育及疾病的发生关系密切[3]。研究发现,人类FGFR1、2、3基因突变可分别导致颅缝早闭(craniosynostosis,CS)、软骨发育不全(achondroplasai,ACH)、CATSHL(camptodactyly, tall stature, scoliosis, and hearing loss)综合征等在内的多

【基金项目】 国家重点基础研究发展计划(973计划,2005CB522604);国家自然科学基金青年科学基金(30301527)

【通信作者】 陈 林,电话:(023) 68757041,E-mail:linchen70@163.com

种骨骼系统发育障碍性疾病[4-6]。FGFRs在骨骼发育过程中的重要作用提示其可能参与调节骨再生过程。既往已有学者利用大鼠股骨骨折模型研究FGFRs在骨折愈合过程中的表达，但FGFRs在骨皮质和骨髓损伤后骨再生修复过程中的表达还没有被系统检测过。胫骨骨皮质损伤模型是通过在胫骨骨干处钻孔，穿透单侧骨皮质，损伤骨外膜、皮质骨和部分骨髓。在该模型中，间充质细胞向损伤部位募集后直接分化为成骨细胞并分泌矿化基质，即单纯通过膜内成骨的方式进行骨再生[7]。本实验通过建立小鼠胫骨骨皮质损伤模型，检测骨皮质损伤后3、7、14、21 d 4个时相点新生骨痂处FGFRs及骨形成标记分子的动态表达谱，观察FGFRs在骨皮质损伤修复过程中的表达，探讨FGFRs对骨皮质损伤后骨形成的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取SPF级6～8周龄雄性C57BL/6J小鼠，由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.2 胫骨骨皮质损伤模型的建立

参照Kim等[7]的方法制作骨皮质损伤模型。1%戊巴比妥腹腔注射(1 ml/kg)麻醉小鼠后，备皮，酒精消毒小鼠左侧下肢。于小鼠左侧胫骨上段纵向剪开皮肤，开口长度约1 cm。分离肌肉组织以暴露胫骨内侧面，采用小型电钻(钻头直径1 mm)于胫骨内侧面中上段1/3处钻孔，钻头须垂直于骨皮质表面。当钻头穿透单侧骨皮质，抵达骨髓腔后(有落空感)即拔出钻头停止钻孔，以保留对侧骨皮质的完整性。最后用生理盐水清洗手术区域，缝合皮肤。小鼠苏醒后于清洁环境下单笼饲养，室温22～24 ℃，湿度60%，定期紫外线消毒与排风。常规给水及饮食，自由活动[8-11]。

1.3 X线观察

损伤后第1天采用小动物活体X线机(Faxitron，美国)对小鼠进行X线摄影，观察模型制作情况，选取模型建立成功的小鼠进行下一步实验。

1.4 组织学分析

成年小鼠胫骨骨皮质损伤后0～6 d为炎症反应期(inflammatory)；在损伤后第7天左右，骨髓腔内可见新生编织骨(regenerating woven bones)；大约14 d，新生骨组织体积达到峰值，此后进入骨改建期(remodeling)，骨髓腔内的骨组织逐渐被破骨细胞吸收；损伤后第21天，皮质缺损处可见新生皮质骨形成[7,11]。故我们在实验中选取了7、14、21 d 3个具有代表性的时相点进行组织学分析。分别于损伤后7、14、21 d处死小鼠，取下左侧胫骨标本置于4%多聚甲醛中4 ℃固定过夜。1×PBS漂洗后用15% EDTA(pH 7.2～7.4)室温下脱钙4～5周。常规石蜡包埋、切片(厚度6 μm)。对切片进行苏木精-伊红(HE)染色，于光镜下观察胫骨损伤部位的修复情况。

1.5 骨组织RNA的提取

在无RNA酶污染条件下取术后3、7、14、21 d左侧胫骨(n=4)用于RNA提取。剥离肌肉和结缔组织，用外科手术刀切下损伤部位2 mm范围的骨组织(包含骨髓)，在液氮中迅速冷冻后研磨成粉末状，采用Trizol法提取总RNA[8-9]。同时提取健侧同样部位骨组织RNA为对照。按TaKaRa反转录试剂盒(Exscript，日本)操作说明书进行逆转录反应。

1.6 定量PCR检测

使用MX3000P定量PCR仪进行，定量PCR反应试剂盒为TaKaRa公司提供(SYBRTM Premix Ex Taq™ Kit，日本)。检测各时相点骨痂组织中成骨细胞分化标记基因核结合因子a1(Cbfa1)、骨钙素(osteocalcin，OC)、骨桥蛋白(osteopontin，OP)及FGFR1、2、3的mRNA表达水平。引物均由Invitrogen公司合成(表1)。扩增条件为95 ℃ 30 s；95 ℃ 5 s(变性)，57 ℃ 20 s(退火)，72 ℃ 15 s(延伸)40个循环；95 ℃ 30 s，57 ℃ 30 s，95 ℃ 30 s。PCR反应体系配制及扩增条件设置参照定量PCR反应试剂盒说明书进行，所有反应做3个复孔。定量PCR仪自动给出熔解曲线分析，得到扩增曲线、熔解曲线和样本的循环阈值(cycle threshold，Ct)值。每份标本目的基因的表达强度用其对应的内参基因(环孢素A结合蛋白，cyclophillin A)的量进行校正。

表1 定量PCR所需引物序列及目的片段长度

基因名称	正义链	反义链	产物长度(bp)
CyclophiliA	5′-CGAGCTCTGAGCACTGGAGA -3′	5′- TGGCGTGTAAAGTCACCACC -3′	82
Cbfa1	5′-CCTGAACTCTGCACCAAGTC-3′	5′- GAGGTGGCAGTGTCATCATC-3′	232
Osteopontin	5′-TGCACCCAGATCCTATAGCC-3′	5′-TGTGGTCATGGCTTTCATTG-3′	105
Osteocalcin	5′-TCTGACAAAGCCTTCATGTCC-3′	5′-AAATAGTGATACCGTAGATGCG-3′	199
FGFR1	5′-GCAGAGCATCAACTGGCTG-3′	5′-GGAGAAGTAGGTGGTATCGCTG-3′	173
FGFR2	5′-GGGTCTCCGAGTATGAGTTGCC-3′	5′- CGCCTCCTTGGGTTTGTCTTTA -3′	183
FGFR3	5′-CCACGGTCTGGGCTAAGGA-3′	5′-ATGGAGCATCTGTTACACGCA-3′	177

1.7 统计学方法

数据以$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件进行独立样本t检验。

2 结果

2.1 胫骨骨皮质损伤模型建立成功

术后小鼠2～3 h可完全苏醒并逐渐恢复正常活动，可自由饮水、饮食及活动。术后次日X线片示小鼠左侧胫骨中上1/3处圆形皮质缺损清晰可见，表示小鼠骨皮质损伤模型建立成功(图1)。



箭头指直径1 cm的圆形皮质损伤部位

图1 小鼠胫骨皮质损伤后1 d X线表现

2.2 损伤修复情况评价

损伤后第7天，小鼠骨髓腔有新生编织骨出现(图2A)；第14天，可见小鼠胫骨皮质缺损处和骨髓腔内被新生骨组织填满(图2B)；到第21天，骨髓腔内新生骨组织已基本被破骨细胞

吸收，而皮质骨缺损处则出现新的板层骨（lamellar cortical bone）（图2C）。在整个愈合过程中未见软骨性骨痂的出现。

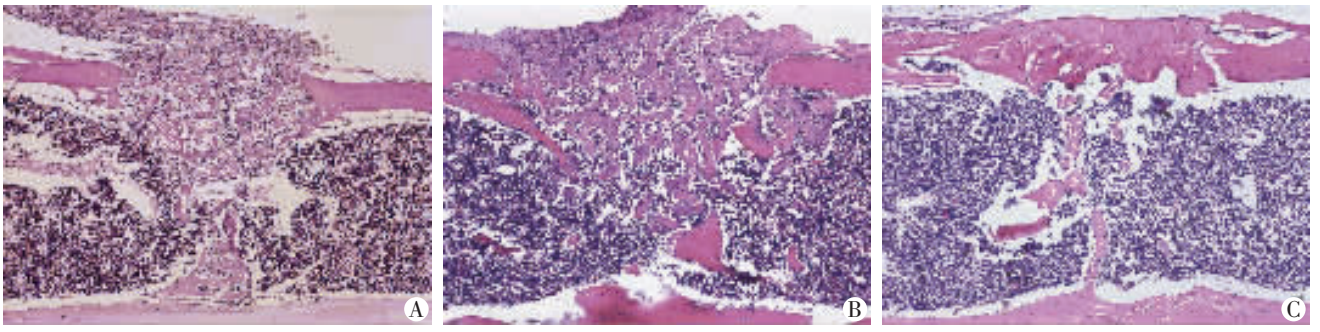
2.3 定量PCR检测新生骨组织mRNA表达水平

与健侧对照相比，Cbfa1、OP的mRNA表达水平在骨皮质损伤后早期即迅速升高，Cbfa1在3 d即达到峰值（$P<0.01$，图3A），而OP则在7 d达到峰值（$P<0.01$），并持续高表达到损伤后21 d（图3B）。相反，OC表达水平在修复阶段中后期开始升高，于损伤后14 d达到峰值水平（$P<0.01$，图3C）。FGFR1、2、3的mRNA表达水平在骨皮质损伤后早期均显著升高，并于整个骨损伤修复过程持续高表达。其中FGFR1、2于3 d达到峰值（$P<0.01$），然后逐渐回落，在21 d后接近正常水平；FGFR3于损伤后7 d达到峰值（$P<0.01$），14 d稍有回落，在修复晚期阶段（损伤后21 d）则又显著升高（$P<0.01$，图4）。

3 讨论

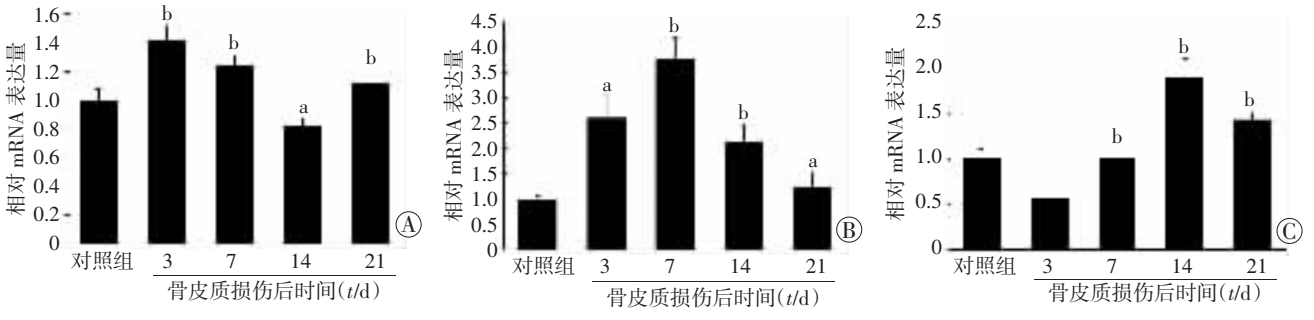
与骨发育过程相似，骨再生修复过程也包括膜内成骨和软骨内成骨两种模式。在通常情况下，二者是交替进行的[1]，但在骨皮质损伤后，骨髓腔内的间充质细胞和骨膜下的骨祖细胞向损伤部位募集，直接分化为成骨细胞，其过程类似于骨发育过程中的膜内成骨[7,10]。

本实验中我们在组织学水平观察到小鼠胫骨骨皮质损伤后所诱发的从骨形成到骨改建的损伤修复的过程同既往文献描述是一致的。我们也检测了骨皮质损伤后成骨细胞分化标记基因Cbfa1、OP及OC等表达变化，以了解骨皮质损伤后的成骨活性。Cbfa1是启动间充质细胞向成骨细胞分化所必需的转录因子[4]，在损伤后3 d即检测到其表达升高，提示损伤早期，间充质细胞已开始向成骨细胞分化；OP也是成骨分化的早期标记分子，在皮质损伤后3 d升高，7 d达到高峰，同样提示早期骨皮质损伤部位的成骨活性；OC是成骨细胞终末分化的标志基因，在骨组织矿化阶段活性增高，其在修复中晚期表达水平上升，提示此时类骨质正



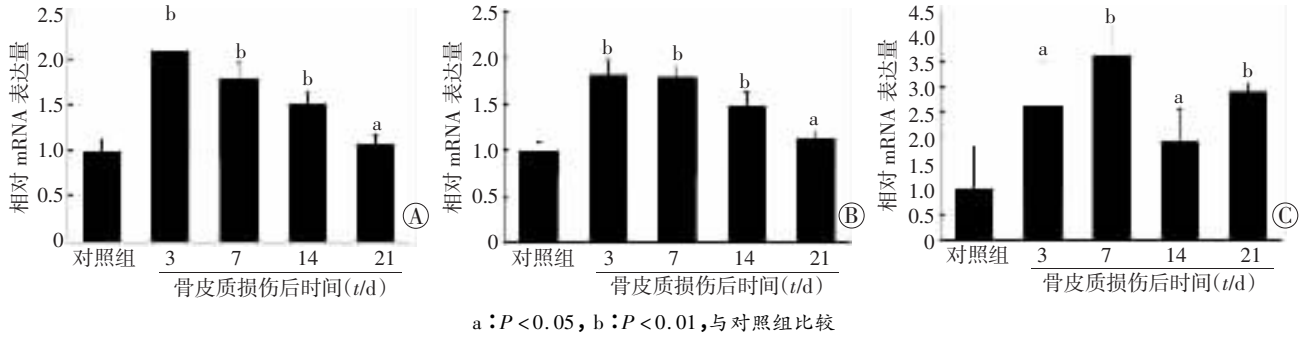
A：损伤后第7天；B：损伤后第14天；C：损伤后第21天

图2 小鼠胫骨皮质损伤部位组织学分析 （HE ×40）



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

图3 定量PCR检测骨皮质损伤后不同时间新生骨组织Cbfa1（A）、Osteopontin（B）、Osteocalcin（C）mRNA的表达



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

图4 定量PCR检测骨皮质损伤后不同时间新生骨组织FGFR1（A）、FGFR2（B）、FGFR3（C）mRNA的表达

处于矿化阶段。

骨再生过程基本再现了胚胎期骨骼发育的主要过程。两者的信号通路也具有一定程度的相似性，许多骨骼发育过程中的重要调控因子如IHH/PTHrP、BMPs、Wnt等在骨再生修复过程中也有表达[2]。FGFs/FGFRs信号通路在骨骼发育过程中发挥重要作用，提示其也参与了骨骼再生过程。

在骨骼发育过程中，FGFR1、FGFR2主要表达于颅骨成骨细胞，参与调控骨生长发育过程中膜内成骨过程。FGFR1、FGFR2突变可促进成骨细胞分化和膜内成骨过程，从而导致颅缝提前闭合[4,12]。而Rundle等[13]通过建立大鼠股骨骨折模型发现，在骨折愈合过程中，FGFR1，FGFR2普遍表达于早期骨膜下增生的间充质细胞，膜内成骨过程中的成骨细胞以及软骨内成骨过程中的软骨细胞和成骨细胞。Schmid等[14]发现，小鼠胫骨骨折后，FGFR1、FGFR2第1天即迅速升高，并分别在第14天和第9天达到峰值。在本实验中，我们检测到，FGFR1，FGFR2从骨皮质损伤后早期(3 d)开始升高，在7、14 d持续高表达，于21 d回落。如前述，骨皮质损伤后，间充质细胞增生并直接分化为成骨细胞。因此我们推测，与骨折愈合过程类似[13-14]，FGFR1、2可能也表达于骨皮质损伤后的间充质细胞和成骨细胞，并参与了骨皮质损伤修复过程。

FGFR3是软骨发育的负性调控因子，主要在生长板静息期和增生期软骨细胞表达[2]。FGFR3功能增强突变可抑制软骨细胞增生分化，导致长骨生长板发育障碍[15-16]。也有证据提示，FGFR3可促进骨骼发育过程中膜内成骨过程。如人类FGFR3 A391E、P250R等功能增强型点突变可引起Muenke综合征和Crouzon综合征，患者出现颅缝处骨组织过度增生，囟门早闭等症状[17]。关于FGFR3在骨折愈合过程中的作用和表达方式，目前研究尚有矛盾之处。Su等[18]发现FGFR3在小鼠骨折愈合各个阶段软骨痂中均有表达，并证明FGFR3能够抑制骨损伤愈合，而Nakajima等[3]则认为，在骨折愈合过程中FGFR3主要表达于肥大前软骨细胞，并且可能促进骨折愈合。而Rundle等[13]发现在大鼠骨折后的骨痂成骨细胞中FGFR3有表达。而本实验结果与Rundle等的观点一致，我们检测到FGFR3在骨皮质损伤后表达升高，提示FGFR3表达于骨皮质损伤后的成骨细胞，可能参与调节骨皮质损伤后的骨再生过程。

综上所述，伴随着成骨细胞分化标记基因的表达升高，FGFR1、2、3的mRNA水平在皮质损伤后早期即升高，并持续高表达到晚期。结合FGFRs在骨骼发育过程中的重要作用，以及既往关于FGFRs在骨折愈合过程中作用的研究，我们认为，FGFRs参与骨皮质损伤后的骨再生过程。了解FGFRs在骨皮质损伤修复过程中的表达变化，可望更好的理解阐明FGFs/FGFRs在骨再生过程中的作用，并为临床应用FGF治疗骨折促进骨形成提供相应的依据。

参考文献：

[1] 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.
[2] 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.
[3] 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.
[4] Ornitz D M, Marie P J. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease[J]. Genes Dev, 2002, 16(12): 1446-1465.
[5] Su N, Du X, Chen L. FGF signaling: its role in bone development and human skeleton diseases[J]. Front Biosci, 2008, 13: 2842-2865.
[6] Toydemir R M, Brassington A E, Bayrak-Toydemir P, *et al*. A novel mutation in FGFR3 causes camptodactyly, tall stature, and hearing loss (CATSHL) syndrome[J]. Am J Hum Genet, 2006, 79(5): 935-941.
[7] Kim J B, Leucht P, Lam K, *et al*. Bone regeneration is regulated by wnt signaling[J]. J Bone Miner Res, 2007, 22(12): 1913-1923.
[8] 谢杨丽，苏楠，金旻，等. 外源性甲状旁腺素对小鼠骨折愈合的影响[J]. 第三军医大学学报，2010，32(10)：1003-1007.
[9] Nagashima M, Sakai A, Uchida S, *et al*. Bisphosphonate (YM529) delays the repair of cortical bone defect after drill-hole injury by reducing terminal differentiation of osteoblasts in the mouse femur[J]. Bone, 2005, 36(3): 502-511.
[10] 苏楠，陈林. 小鼠骨损伤模型在骨修复机制研究中的应用[J]. 国际病理科学与临床杂志，2007，27(3)：271-276.
[11] Lu C, Huang S, Miclau T, *et al*. Mepe is expressed during skeletal development and regeneration[J]. Histochem Cell Biol, 2004, 121(6): 493-499.
[12] Song S J, Hutmacher D, Nurcombe V, *et al*. Temporal expression of proteoglycans in the rat limb during bone healing[J]. Gene, 2006, 379: 92-100.
[13] Rundle C H, Miyakoshi N, Ramirez E, *et al*. Expression of the fibroblast growth factor receptor genes in fracture repair[J]. Clin Orthop Relat Res, 2002, (403): 253-263.
[14] Schmid G J, Kobayashi C, Sandell L J, *et al*. Fibroblast growth factor expression during skeletal fracture healing in mice[J]. Dev Dyn, 2009, 238(3): 766-774.
[15] Murakami S, Balmes G, McKinney S, *et al*. Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype[J]. Genes Dev, 2004, 18(3): 290-305.
[16] 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.
[17] Coumoul X, Deng C X. Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases[J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2003, 69(4): 286-304.
[18] Su N, Yang J, Xie Y, *et al*. Gain-of-function mutation of FGFR3 results in impaired fracture healing due to inhibition of chondrocyte differentiation[J]. Biochem Biophy Res Commun, 2008, 376(3): 454-459.

(收稿 2011-01-18 修回 2011-03-02)
(编辑 汪勤俭)