

· 论著 ·

成纤维生长因子在大鼠后肢骨骼发育早期不同阶段表达的变化及意义

徐 平 马瑞雪

【摘要】 目的 通过大鼠肢体发育早期血清学成纤维生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)的表达以及后肢标本中碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的表达情况,观察其在大鼠后肢肢体骨骼发育早期过程中,组织学上随时间变化的规律。**方法** 将 5 只清洁级孕鼠的新生鼠分组为 A、B、C、D、E 五组,分别为 10、6、8、6、6 只。用 ELISA 法测定各组血清中 FGF 的浓度,并对其后肢标本进行 bFGF 的免疫组化染色,从而观察 bFGF 在关节软骨、骨骺、干骺端及骨膜中的表达情况。**结果** 在新生小鼠的后肢标本免疫组化染色中,bFGF 在软骨、骨膜和关节面均有表达,且随出生后时间的变化存在一定的规律:①在关节软骨中 bFGF 在关节面软骨的表达要强于中心部位的软骨,这种表达随出生后天数增加呈逐渐减弱的趋势。②bFGF 在骨骺部增殖层和肥大细胞层以及骨膜内早期表达较强,随时间变化呈逐渐减弱趋势,在出生后 10 d 以后 bFGF 表达已不明显。③在干骺端成骨细胞内 bFGF 的表达不同于它在其他组织内的表达,一直呈现为较高表达,并不随出生后时间的延长而呈现减弱趋势。**结论** 在大鼠后肢发育早期,bFGF 在后肢肢体各组织中存在良好的表达,提示它在肢体发育过程中与软骨增殖、关节发育与关节内软骨基质的形成和发育有密切的关系。

【关键词】 骨骼;骨发育/免疫学;大鼠

The changes and It's meanings of PGF expressed in lower Limb of the rats in different times in the early stage of development. XU ping, MA Rui-xue. Pediatrics Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai, 200032, China.

【Abstract】 Objective To explore the FGF expressed in the lower limbs of rats, especially the changes of the expression of bFGF. Through the immunohistochemistry staining combined with orrthology study, to identify whether the expression of FGF changes with the time goes. **Methods** The neonatal rats of 5 cleaning SD pregnant rats were divided into 5 groups. (from group A to E, with 10, 6, 8, 6, 6 rats respectively) Through the immunohistochemistry staining, the expression of FGF-2 was defined in the tissue (cartilage, periosteum, epiphysis) of both sides of the lower limbs of the neonatal rats, the day after birth 1, 3, 5, 10, 15 days respectively, and the expressions of FGF in the serum in C, D, E groups (it was hard to get enough blood in group A and B). From the experiment, the changes and ranges of the expression of FGF were observed. It can be inferred the value of the changes in the early stage of the development of the limbs. **Results** According to the experiment, it was identified that there were good expressions of bFGF in lower limbs of the neonatal rats. bFGF is expressed in different kinds of tissues, such as expressed in cartilage, epiphysis, periosteum. With the time went on, the expression intensity was reduced. In serology study, it was found that FGF expressed in serum 5 days after the birth, in the same time, there was not found the expression of the FGF in group D and E. And there is significant difference in static analysis between group C, D and group C, E ($P < 0.01$). And no static difference between group D, E. **Conclusions** There was good expression in the lower limb tissue during the early stage of the development of the limbs of the rats, which prompts there was great relationship with the development of cartilage, articulation.

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2012.03.004

作者单位:复旦大学附属儿科医院骨科(上海市,200032), E-mail: Pmdxu@126.com, 基金项目:上海市卫生局资助项目(编号 034006)

【Key words】 Skeleton; Bone Development /IM; Rats

成纤维生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)是一种具有广泛生物学效应的生长因子,具有促进血管生成、影响胚胎发育、刺激成纤维细胞增殖和加速伤口愈合等作用,其中碱性成纤维生长因子(base fibroblast growth factor, bFGF)表达范围最广,也最为重要。本实验通过在大鼠肢体发育早期 FGF 在血清及组织中 bFGF 的表达范围及变化规律,探讨其在肢体发育过程中的作用,从而为研究 FGF 在肢体发育异常的动物模型中的作用提供实验参考。

材料与方法

一、材料

1. 实验动物:取清洁级 SD 孕鼠 5 只,生产正常新生鼠共 36 只,实验所用动物由复旦大学医学院实验动物房提供、喂养。

2. 实验试剂:bFGF 单克隆抗体由 Santa cruz Biotechnology, INZ 提供;二抗及显色剂、FGF ELISA 试剂盒和抗体稀释液均由上海迪奥生物技术有限公司提供。

3. 实验仪器:ELISA 分光光度计和组织切片显微镜及摄像系统。

二、方法

1. 研究内容和分组:以 5 只清洁级孕鼠的新生鼠为实验样本量。在 5 只清洁级孕鼠生产前随机确定 A、B、C、D 和 E 组鼠, A ~ E 组鼠分别生产 10、6、8、6 和 6 只新生鼠。分别于生后 1 d(A 组)、3 d(B 组)、5 d(组)、10 d(D 组)和 15 d(组)处死,留取血清及双侧后肢的标本,由于 A、B 组鼠(生后 1 d、3 d)太小,难以留取 0.5 mL 血清,仅留取 C ~ E 组鼠的血清。C ~ E 组留取 8、6、6 份血清标本, A ~ E 组留取肢体标本 20、12、16、12、12 个。具体分组及留取标本情况见表 1。

表 1 新生鼠后肢组织标本及血清标本留取情况

分组	A 组鼠 (1 d)	B 组鼠 (3 d)	C 组鼠 (5 d)	D 组鼠 (10 d)	E 组鼠 (15 d)
新生鼠(只)	10	6	8	6	6
血清标本(份)	—	—	8	6	6
后肢标本(只)	20	12	16	12	12

2. 标本的处理:取得 C、D、E 组血液标本,静置 1 h 后进行离心,取离心管内上层澄清血清, -10 ℃ 冰箱保存,ELISA 测定血清中 FGF 浓度。将取得的

各组后肢标本用 10% 甲醛溶液固定,制作成石蜡切片,每个标本取 4 张石蜡切片,其中 3 张 bFGF 的免疫组化染色;1 张 HE 染色与 bFGF 免疫组化染色切片进行对照和识别。

3. 组织免疫组化染色:免疫组化染色采用酶标抗体法(二步法),基本步骤如下:①切片 60 ℃ 烤箱内烤片 1 h;②二甲苯脱脂,共 3 次,每次 30 min,梯度乙醇复水,PBS 液洗涤 3 次;③柠檬酸微波抗原修复,冷却至室温,PBS 液洗涤 3 次;④切片置于湿盒内,加入由 1% 牛血清白蛋白稀释至 1:200 的 bFGF 单克隆抗体(根据预实验抗体稀释至 1:200 显色较好),4 ℃ 冰箱内孵育 12 h,PBS 液洗涤 3 次,洗去多余的一抗;⑤加入 HRP 标记的二抗,在 37 ℃ 暖箱内孵育 1 h,PBS 液洗涤 3 次;⑥加入 DBA 显色剂(20 μL 显色剂加入 1 mL 稀释液配置而成),PBS 液洗去多余的显色剂;⑦封片显微镜下观察并摄片,阳性染色呈棕黄色。

三、统计学处理

应用 SPSS 11.5 统计软件,计算各组中血清 FGF 的浓度,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间采用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

结果

一、血清标本 FGF 浓度测定

对 C ~ E 组血清学标本进行 2 次测量,测得浓度见表 2。从血清学数据可见:生后第 5 天,血清中可见 FGF 表达,而生后第 10 天及生后第 15 天血清学表达很少,甚至无明显表达。运用 SPSS 11.5 统计软件分别对 CD 组、CE 组和 ED 组进行秩和检验,发现 CD 组、CE 组间存在显著统计学差异($P < 0.01$),而 DE 组统计学差异不明显($P > 0.05$)。可见 C 组(出生后 5 d)血清中有 FGF 表达,而 D 组(生后 10 d)、E 组(生后 15 d)血清中 FGF 的表达已不明显,这种表达在时间上的变化差异明显。

二、免疫组化染色结果

1. bFGF 在关节软骨中的表达:在关节软骨面可见 bFGF 表达,在关节软骨面软骨组织中的表达强于关节中心部位的软骨,表达较为密集,中心部位软骨组织中呈散在棕黄色颗粒表达。在时间上呈现出从生后 1 ~ 15 d 表达逐渐减弱的趋势(图 1-A ~ 1-

E, 箭头所指为各组关节软骨面 bFGF 的表达)。

2. bFGF 在骨骺部及骨膜内的表达: 在骨骺部增殖层、肥大细胞层以及骨膜内(箭头所指)可见 bFGF 表达, 这种表达同样在时间上呈现逐渐减弱的趋势(图 2-A~2-E), A 组(生后 1 d)、B 组(生后 3 d) bFGF 表达较强, D 组(生后 10 d)及 E 组(生后 15 d)表达很弱。bFGF 在骨膜中的表达要强于增殖部及肥大软骨细胞层。

3. bFGF 在成骨细胞中的表达: 在生后 1 d 即 A 组中, 整个长骨均为软骨组织, 未见明显髓腔形成(图 3A), 即此时还处于膜内成骨的软骨雏形期。bFGF 在 B 组~E 组干骺端的成骨细胞中均见表达, 且这种表达不同于 bFGF 其他组织中表达随生后天数增加逐渐减弱的趋势, 而是在出生 3~15 d 内均有较强表达, 无明显减弱趋势(图 3B~E)。

上述组织学切片显示, bFGF 在肢体发育早期,

表 2 C、D、E 组血清 FGF 浓度及均值(单位: ng/mL)

标准样品	C 组(5 d)		D 组(10 d)		E 组(15 d)	
	第 1 次	第 2 次	第 1 次	第 2 次	第 1 次	第 2 次
0	-0.013	0.026	-0.055	-0.047	-0.138	-0.034
0.33	0.56	0.578	-0.031	0.034	-0.078	-0.055
1.32	0.51	0.294	-0.101	-0.114	-0.031	-0.099
3.3	0.104	0.391	-0.012	0.132	0	0.138
10	0.359	0.755	-0.094	-0.029	-0.197	-0.14
20	0.596	0.106	-0.065	-0.042	-0.14	-0.148
	0.244	-0.088				
	0.057	-0.008				
$\bar{x} \pm s$	0.279 \pm 0.264 *		-0.035 3 \pm 0.067 #		-0.077 \pm 0.090 ##	

注: 对各组间进行秩和检验, * 与 # 相比, $P=0.0007$ ($P<0.01$); * 与 ## 相比, $P=0.0004$ ($P<0.01$); # 与 ## 相比, $P=0.1331$ ($P>0.05$)

在关节软骨、骨骺部肥大细胞层和增殖层、骨膜、骨骺干骺端成骨细胞均有良好的表达。①在关节软骨中 bFGF 表达较强, 在关节面软骨的表达要强于中心部位的软骨, 且随出生后天数增加呈逐渐减弱的趋势。②bFGF 在骨骺部增殖层和肥大细胞层以及骨膜内可见表达, 早期表达较强, 随时间变化呈逐渐减弱趋势, 在 D 组(生后 10 d)及 E 组(生后 15 d)中表达已不明显。③在 B~E 组干骺端成骨细胞中可见 bFGF 表达, 且这种表达不同于它在其他组织内的表达, 随生后时间的延长表达变化并不明显, 一直为较高表达。

结合血清学 FGF 表达浓度与组织学中 bFGF 免疫组化染色, 生后 5~15 d, 血清学中 FGF 的表达情况和组织学 bFGF 的表达基本一致, 但在成骨细胞内表达呈现出的一致。

讨 论

成纤维生长因子(fibroblast growth factors, FGF)是一类具有广泛生物学效应的生长因子, 在肢体发育、血管发生、促进组织愈合、甚至肿瘤转移过程中有着重要作用。其中 FGF-2(也称 bFGF)表达范围最广, 也最重要。长骨的发生主要是软骨内成骨, 软

骨内成骨又是经过软骨雏形形成、软骨周骨化以及软骨内骨化完成。本实验所选研究时间为大鼠生后 1~15 d, 在这个过程中肢体发育由软骨雏形, 到软骨周骨化、软骨内骨化初级骨化中心出现。而次级骨化中心的出现在生后较长时间, 本实验未进行这方面的观察。

在骨与软骨的发育过程中, FGF 即参与膜内化骨, 同时也参与软骨内成骨。在干骺端生长板处有着良好的表达, 主要表达在增殖层和肥大软骨细胞层, 从而对骨骺的生长进行调节。通过基因敲除小鼠 FGF 在生长板上主要受体 FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3) 的研究发现, FGF 对增殖层和软骨细胞层的增殖起抑制作用^[1-2]。它和 BMP 促进软骨增殖的作用相拮抗, 两者均通过调节 Ihh (Indian Hedgehog) 基因来发挥作用^[2-3]。既往研究认为, FGF18 是 FGFR3 的主要受体, 在调节软骨发育中起重要作用。最新研究发现, 在胎儿软骨细胞中存在 FGF1、2、17、19 的表达, 且以 FGF2 (即 bFGF) 对软骨细胞增殖起着最重要的生物学效应^[4]。而在成骨细胞中, bFGF 能促进成骨细胞分裂增殖, 使骨钙上升, 碱性磷酸酶活力下降, 培育的成骨细胞亦能分泌 bFGF, 提示 bFGF 作为一种局部生长因子调节骨形成过程。最近 Fakhry^[5] 等用不同成熟阶

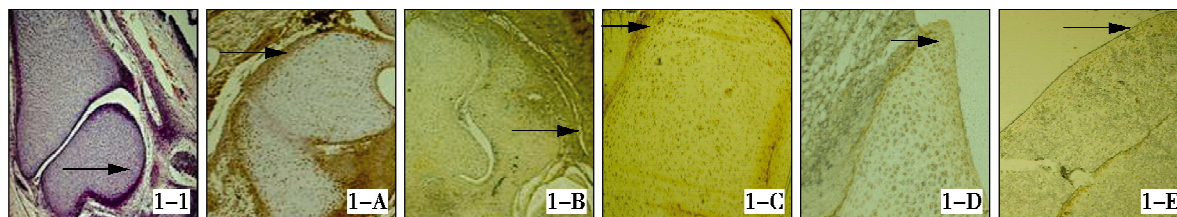


图 1(A ~ E) 各组关节组织中 bFGF 的免疫组化染色。图 1-1 为关节软骨的 H.E. 染色, 用于和进行免疫组化染色对照, 进行组织识别。图 1-A(生后 1 d): 见关节软骨面软骨中有粗大深染的棕黄色颗粒表达, 而关节中心软骨组织可见散在的深染颗粒。图 1-B(生后 3 d): 可见关节软骨面组织中有较深的棕黄色颗粒表达, 中心部软骨有散在棕黄色颗粒。图 1-C(生后 5 d): 可见关节面组织中棕黄色颗粒表达, 颜色稍淡。图 1-D(生后 10 d): 可见关节面软骨组织中较淡的棕黄色颗粒。图 1-E(生后 15 d): 关节面软骨组织中几乎无明显棕黄色颗粒。(图 1-1 HE 染色, $\times 100$, 图 1-A ~ 1-E bFGF 免疫组化染色, $\times 100$)

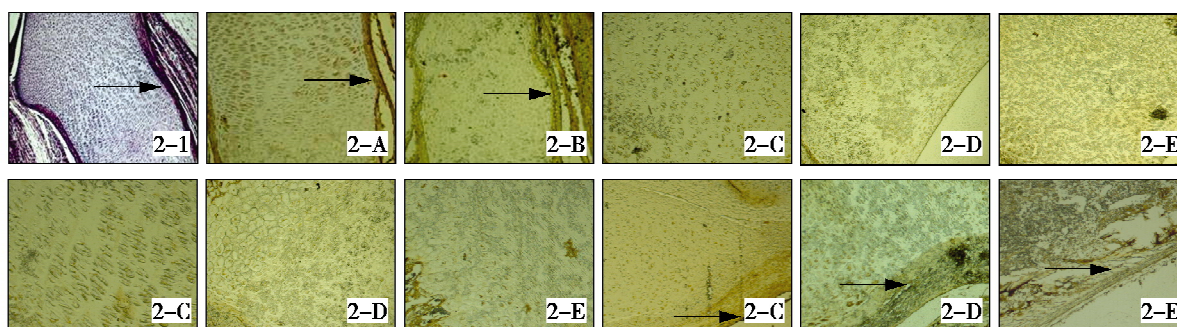


图 2(A ~ E) 各组骨骺部增殖层、肥大细胞层和骨膜中 bFGF 的免疫组化染色。图 2-1 为骨骺部与骨膜组织的 H.E. 染色, 用于和进行免疫组化染色对照, 进行组织识别。图 2-A(生后 1 d): 可见骨膜呈棕黄色深染, 增殖层、肥大细胞层软骨细胞内有散在粗大深染的棕黄色颗粒表达。图 2-B(生后 3 d): 可见骨膜呈棕黄色较深染色, 增殖层、肥大细胞层软骨细胞内有散在棕黄色颗粒表达。图 2-C(生后 5 d): 可见骨膜呈棕黄色染色, 增殖层、肥大细胞层软骨细胞内有散在较浅的棕黄色颗粒表达。图 2-D(生后 10 d): 可见骨膜棕黄色较淡, 增殖层、肥大细胞层软骨细胞内棕黄色颗粒表达非常浅。图 2-E(生后 15 d): 可见骨膜棕黄色染色不明显, 增殖层、肥大细胞层软骨细胞内几乎无棕黄色颗粒表达(图 2-1 HE 染色, $\times 100$, 图 2-A ~ 2-E bFGF 免疫组化染色, $\times 100$)。

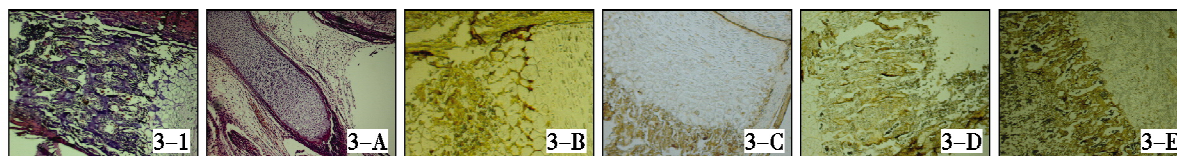


图 3(B ~ E): B 组 ~ E 组各组骨骺骨骺干骺端成骨细胞内 bFGF 的免疫组化染色。图 3-1 为骨骺干骺端成骨细胞的 H.E. 染色, 用于和进行免疫组化染色对照, 进行组织识别。图 3-A(生后 1 d, 长骨 HE 染色): 此时可见这个长骨均为软骨组织, 尚未见髓腔的出现, 及此时处于膜内化骨的软骨雏形期。图 3-B(生后 3 d): 骨骺干骺端成骨细胞内有较深的棕黄色颗粒表达。图 3-C(生后 5 d): 可见骨骺干骺端成骨细胞内棕黄色染色较深。图 3-D(生后 10 d): 可见骨骺干骺端成骨细胞内深染, 而此时可见肥大细胞层染色很浅。图 3-E(生后 15 d): 骨骺干骺端成骨细胞内染色较深, 与前面几组相比染色强度减弱不明显。(图 3-1、3-A: HE 染色, $\times 100$, 图 3-B ~ 3-E bFGF 免疫组化染色, $\times 100$)

段的颅骨祖细胞来研究其对 bFGF 的反应, 结果显示 bFGF 可刺激大多数成熟骨细胞的增殖, 但不包括未分化的骨细胞, 而且持续应用 bFGF 可抑制几种成骨细胞标志基因的表达和矿化, 而先用 BMP-2 处理后再用 bFGF 处理则可明显促进矿化作用。这些研究表明 bFGF 的功能效应非常复杂, 其生物学效应可能依赖于成骨细胞分化的不同阶段、和其他生长因子的相互作用或者细胞与生长因子作用时间和方式的不同等。本实验发现新生鼠出生早期在增殖层和肥大细胞层中 FGF 表达较强, 而在生后

10 d、15 d 的表达减弱, 在组织学上, 此时可见增殖层、肥大细胞层的细胞层明显增加, 肢体骨向两端明显增长, 所以组织中 bFGF 表达的减弱可能在增殖层和肥大细胞层增殖过程中起了一定作用。本实验通过组织学和血清学相结合的方法进行观察发现, 大鼠生后 10 d、15 d 在血清学中已很难检测到 FGF, 而在组织学 bFGF 染色中发现在干骺端成骨细胞内仍有较强表达, 与血清学所得结果不平行, 从而间接证实了 bFGF 在成骨细胞中是通过局部调节来发挥生物学作用的。

Nakamura 等^[6]在运用 rh-bFGF 对 41 条比格犬的胫骨骨折的治疗评价和分析中发现, rhFGF 组骨膜内间充质细胞增加, 由间充质细胞分化而成的成骨细胞及软骨细胞的数量也增加。在软骨内成骨过程中, 软骨膜深层的骨原细胞分裂并分化成成骨细胞。本实验中观察到在这一过程中 bFGF 在骨膜内可见较强表达, 提示在肢体发育过程中 bFGF 可能起到了促进软骨膜内间充质细胞分化成为成骨细胞的作用。

本实验中可以见到在关节软骨面上, bFGF 有很强的表达, 在关节软骨面的表达要强于中心部位的软骨。在组织学上, 由于关节具有特殊的运动功能, 关节表面有着大量胶原纤维加固软骨细胞, 其中软骨内以 II 型胶原为主。苏新等^[7]通过在兔关节软骨的体外实验中发现, bFGF 和 IGF-1 可以促进关节软骨对 II 型胶原的表达, 且两者同时运用有协同的作用。杜俊杰等^[8]在小鼠体内实验中证实 bFGF 可以增强 rhBMP 诱导成骨中的 I、II 型胶原以及碱性磷酸酶的表达。同时关节软骨面除了丰富的胶原纤维以外, 还有蛋白多糖帮助加固软骨。徐卫东等^[9]在兔关节软骨的体外实验中发现, bFGF 除了促使胶原合成以外, 对关节蛋白多糖的表达也有重要促进作用, 且这种作用在浓度和时间上呈正相关。可见 bFGF 对关节面胶原以及蛋白多糖的合成有着重要作用。本实验也证实了新生鼠后肢的关节软骨面上 bFGF 有很强的表达, 提示 FGF 在肢体发育过程中对关节软骨基质合成有着重要作用。这种表达在时间上及组织表达上有着相对的特异性。

参考文献

- 1 Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, et al. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation[J]. *Development*, 2001, 128:4523-4534.
- 2 Minina E, Kreschel C, Naski MC, et al. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation[J]. *Dev Cell*, 2002, 3:439-449.
- 3 Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, et al. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation[J]. *Development*. 2001, 128:4523-4534.
- 4 Krejci Pavel, Krakow, Deborah, et al. Fibroblast Growth Factors 1, 2, 17, and 19 Are the Predominant FGF Ligands Expressed in Human Fetal Growth Plate Cartilage[J]. *Pediatric Research*, 2007, 61(3):267-272.
- 5 Fakhry A, Ratisoontorn C, Vedachalam C, et al. Effects of FGF2/-9 in calvarial bone cell cultures: differentiation stage-dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin, and enhancement of osteogenic potential[J]. *Bone*, 2005, 36(21):254-266.
- 6 Nakamura T, Hara Y, Tagawa M, et al. Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture[J]. *J Bone Miner Res*, 1998, 13:942-949.
- 7 苏新, 戴心怡, 张耀娟, 等. bFGF、IGF-I 对兔关节软骨细胞 II 型胶原表达的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2006, 26(5):326-342.
- 8 杜俊杰, 罗卓荊, 胡蕴玉. bFGF 增强 rhBMP-2 诱导成骨中 I、II 型胶原及碱性磷酸酶的表达[J]. *临床骨科杂志*, 2002, 9(1):39-42.
- 9 徐卫东, 吴岳嵩, 赵定麟. FGF 对兔关节软骨细胞基质胶原和蛋白多糖的影响[J]. *中国矫形外科杂志*, 1998, 6(5):541-542.
- 10 Sankar WN, Neuberger CO, Moseley CF. Predictors of the need for femoral shortening osteotomy during open treatment of developmental dislocation of the hip[J]. *J Pediatr Orthop*, 2009, 29(8):885-888.
- 11 Sankar WN, Tang EY, Moseley CF. Predictors of the need for femoral shortening osteotomy during open treatment of developmental dislocation of the hip[J]. *J Pediatr Orthop*, 2009, 29(8):868-871.
- 12 Sankar WN, Neuberger CO, Moseley CF. Femoral anteversion in developmental dysplasia of the hip[J]. *J Pediatr Orthop*, 2009, 29(8):885-888.
- 13 Sankar WN, Tang EY, Moseley CF. Predictors of the need for femoral shortening osteotomy during open treatment of developmental dislocation of the hip[J]. *J Pediatr Orthop*, 2009, 29(8):868-871.

(上接第 170 页)

struction for developmental dysplasia of the hip after walking age. *Journal of pediatric orthopaedics*[J]. Part B, 2007, 16(2):84-89.

- 12 Sankar WN, Neuberger CO, Moseley CF. Femoral anteversion in developmental dysplasia of the hip[J]. *J Pediatr Orthop*