

失神经对大鼠骨折愈合及 FGFR3 表达的 作用机制研究*

赵军伟^{1,2} 李争争^{1,2} 孟会强^{1,2} 李 康^{1,2} 罗 伟^{1,2} 汪玉良^{*,1}

(1. 兰州大学第二医院骨科, 兰州 730030; 2. 甘肃省骨关节疾病重点实验室, 兰州 730030)

摘要:目的 通过检测大鼠骨折端成纤维细胞生长因子受体 3 (FGFR3) 的表达量, 探讨失神经在骨折愈合过程中对 FGFR3 表达的作用机制。方法 将 96 只成年健康雌性 wistar 大鼠随机分为实验组和对照组。实验组建立 T₁₀ 脊髓离断下的胫骨骨折模型, 对照组行单纯胫骨骨折模型, 分别于术后第 3、5、7、14、21、28 天取标本 (每个时间点 = 8 只), 经固定、脱钙处理后, 与骨折端上下 5 mm 处修剪标本, 石蜡包埋, 切成 6 μ m 切片。切片应用 HE 染色、原位杂交及 masson 三色染色。术后第 7、14、21、28 天拍 X 片。结果 脊髓神经离断后骨折愈合加速, 各时间点实验组 FGFR3 的表达量均高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 并具有时间分布特点, 第 3 天时较少, 第 5 天时开始升高, 第 7 天达到高峰, 随后逐渐降低, 并在第 28 天 FGFR3 mRNA 细胞数趋于 0。结论 FGFR3 是骨折愈合过程中的一种膜蛋白, 其表达受神经因素的调节。脊髓离断后, 可通过调节 FGFR3 的表达量来加速骨折的愈合。

关键词: 成纤维细胞生长因子受体; 失神经; 骨折愈合; 脊髓损伤

中图分类号: R683

文献标识码: A

doi: 10.16507/j.issn.1006-6055.2016.05.031

Study on Function Mechanism of Denervation on Fracture Healing and Expression of FGFR3 in Rats*

ZHAO Junwei^{1,2} LI Zhengzheng^{1,2} MENG Huiqiang^{1,2} LI Kang^{1,2}

LUO Wei^{1,2} WANG Yuliang^{*,1}

(1. Department of Orthopedics, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030;

2. Bone and Joint Diseases Key Laboratory of Gansu Province, Lanzhou 730030)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) expression on rats denervated fracture healing by detecting the expression amount of FGFR3 in fracture end. **Methods** Ninety-six healthy adult female wistar rats were randomly divided into experimental and control groups. For the experimental group, complete spinal cord injury was established under the T₁₀ segment in tibial fracture model rats. The control group underwent only a simple tibia fracture surgery. Tissue sample were collected after 3, 5, 7, 14, 21 and 28 days ($n = 8$ for each time point) at the fracture site at the top and bottom of each 5-mm cut tibia. Samples were fixed and decalcified, specimens were embedded with paraffin, and 6- μ m slice was prepared. Slice applied HE staining, in situ hybridization, and masson trichrome. Postoperative X-rays were taken on day 7, 14, 21 and 28. **Results** After spinal cord was transected, fracture healing was accelerated. Expression of FGFR3 in the experimental group at each time point were elevated significantly ($P < 0.05$), Expression of FGFR3 had a time distribution, the characteristic was that FGFR3 mRNA positive cell number was less on the third day, beginning to rise on the fifth day, reaching the peak on the seventh day, gradually decreasing and FGFR3 mRNA cell count going to zero on the twenty-eighth day. **Conclusion** FGFR3 is a membrane protein involved in fracture healing and its expression was adjusted by Nerve Element. After spinal cord transection fracture healing can be accelerated by regulating the FGFR3 expression quantity.

Key words: fibroblast growth factor receptor; denervation; fracture healing; spinal cord injury

1 引言

骨折的修复是一个反应复杂的过程, 包括血肿

炎症机化期、原始骨痂形成期、骨板形成塑形期^[1]。修复过程中有许多炎性介质参与, 其中成纤维细胞生长因子是一种重要的细胞因子, 相应的成纤维细胞生长因子受体在细胞的增殖分化、凋亡中起着重要作用^[2]。成纤维细胞生长因子受体 3 (FGFR3) 是一种能够自身磷酸化的蛋白激酶受体。大量研究表明, 该受体在组织损伤、细胞增殖分化、骨骼重建中

2016-03-14 收稿, 2016-05-13 接受, 2016-09-21 网络发表

* 甘肃省科技支撑计划(0412E2)资助

* * 通讯作者, E-mail: wy160918@sina.com

发挥着重要作用,并且是成纤维细胞受体家族中唯一一个参与骨重建负向调控的跨膜蛋白^[3]。临床上经常可见脊髓损伤后,骨折愈合速度加快,骨痂数量明显增多,这种现象是否与骨痂中 FGFR3 的表达量有关,目前还没有明确的结论。

近年来研究发现:FGFR3 主要在软骨成骨过程中发挥作用,在细胞水平上能够抑制骨髓间充质干细胞向软骨细胞、成骨细胞增殖分化,促进破骨细胞的增殖分化^[4],并且通过激活 ERK/RAS 信号通路调节软骨细胞进入过早的凋亡、细胞外基质的流失、以及细胞形态的改变,细胞生长停滞,从而来调节骨的代谢^[5]。有学者^[6]发现失神经后骨痂的直径较单纯骨折组大,脊髓神经损伤后,大鼠胫骨骨折愈合加速,纤维软骨痂增生,骨小梁排列紊乱,矿化能力下降,骨密度降低,这些变化是否通过脊髓神经损伤影响 FGFR3 的表达,目前该机制还不太清楚。

为此,本实验通过建立失神经骨折模型及单纯骨折模型,应用原位杂交、HE 染色、masson 染色等方法从分子水平和细胞水平来探讨失神经后骨折愈合的变化,并通过 FGFR3 的时空表达量的变化,来证明神经支配与 FGFR3 的关系,从而为临床治疗失神经骨折提供理论依据。

2 材料与方法

1) 主要材料与试剂

健康成年雌性 wistar 大鼠,体重 180 ~ 200g,6 ~ 8 周龄,SPF 级,购自甘肃省中医药大学实验动物中心,实验单位使用许可证号:SYXK(甘)2015-0005。主要实验试剂:SSC(购自武汉博士德)、Masson 染色试剂盒(购自北京索莱宝科技有限公司)。

2) 动物分组

将 96 只大鼠随机分为实验组(失神经 + 胫骨骨折)和对照组(胫骨骨折),每组各 48 只,又分为术后 3、5、7、14、21 及 28 天,每个时间点 8 只大鼠。

3) 模型建立

(1)实验组:2% 戊巴比妥钠 0.25 ml/100 g 腹腔注射麻醉,将大鼠俯卧位固定于手术台上,备皮,铺无菌洞巾,定位后以 T₁₀为中心,行后正中纵行切口,暴露 T₉-T₁₁ 的椎板,用咬骨钳咬除 T₁₀ 棘突、横突,后椎板,暴露出硬脊膜,用眼科剪剪断脊髓,目视下确定脊髓离断。见大鼠尾巴甩动,双后肢抽搐,随后双后肢完全松弛,用针扎尾巴及双后肢见无反应

后,用生理盐水反复冲洗伤口,用凝胶海绵填充于脊髓离断处,压迫止血。用 2-0 缝线依次逐层缝合肌肉层、深筋膜,皮肤。无菌辅料包扎。然后于大鼠右内侧膝关节处行切开约 0.5 cm 的小口,在髌腱处用电钻插入直径 0.8 mm 的克氏针髓腔内固定,分离胫骨中上 1/3 处的肌肉,将插入的克氏针拔出 2/3,用弯钳自分离筋膜肌肉处穿入以稳定胫骨,然后用线锯截断胫骨,及时用生理盐水冲洗胫骨断面,然后再将克氏针插入并对合胫骨,逐层关闭伤口。术后伤口涂撒头孢曲松粉末。

(2)对照组:术前准备同上,但不离断 T₁₀ 脊髓,同法制备胫骨骨折模型。

4) 标本的制备

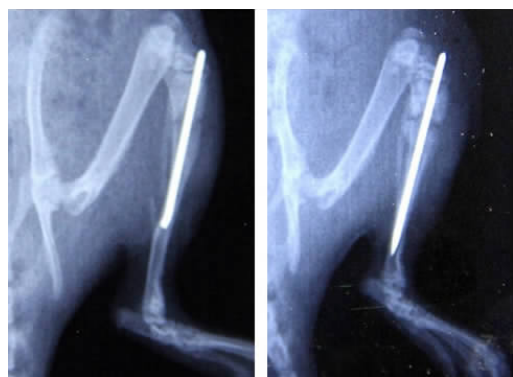
实验组与对照组分别于术后第 3、5、7、14、21、28 天采用腹腔注射麻醉法处死大鼠并取整个患肢,取材过程中避免损伤骨膜以免破坏骨痂。取出新鲜的标本迅速放入 4% 的多聚甲醛中固定 24 h,随后放入 15% 的 EDTA 中脱钙,三天换一次液,直至脱钙完成(针穿透无阻滞感)。取出脱钙完成的骨组织,进行修剪,与骨折线上下 5 mm 处剪断。随后进行包埋石蜡切片(厚度)6 μ m,用于 HE 染色、masson 染色、原位杂交。

5) Masson 染色

常规染色,从形态学观察骨折的愈合情况及其形态变化。

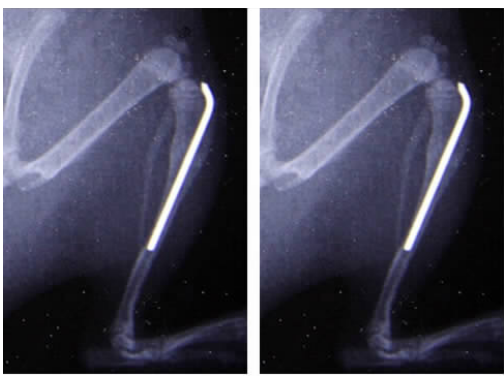
6) 原位杂交

(1)石蜡切片先进行脱蜡和水化:用二甲苯及不同浓度梯度的酒精进行脱蜡和水化。(2)去蛋白、固定:用 4% 的多聚甲醛进行固定 25min,双蒸水洗涤,25℃ 下,胃蛋白酶中处理 1 min,洗涤,室温下 1% 的多聚甲醛再固定 10 min,洗涤三次。(3)杂交:1 μ g/ml 的探针杂交缓冲液,加热至 80℃,15 min 迅速冷却,在切片上滴加 15 μ l 预杂交液,恒温 40℃ 过夜。(4)洗涤:70℃ 5 $\times$ SSC 液中孵育 30 min,直至盖片浮起,室温下放置 15 min。(5)阻断:在切片上滴加 SABC,室温放置 30 min。(6)抗体孵育:在切片上滴加原位杂交专用的生物素化过氧化酶,室温放置 30 min,4℃ 过夜,然后洗涤,室温放置 15 min。(7)DAB 显色:显色试剂 A、B、C 混合滴加到切片上,显色后冲洗。(8)复染:使用苏木素对切片复染,双蒸水冲洗。(9)中性树胶封片。结果判定:胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性细胞。



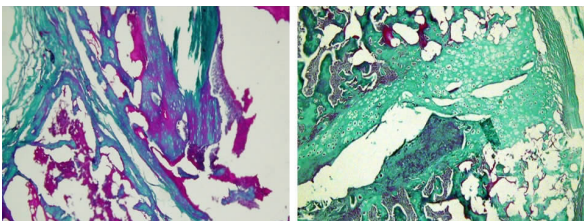
(a) 实验组 (b) 对照组

图 1 7 天 X 线片



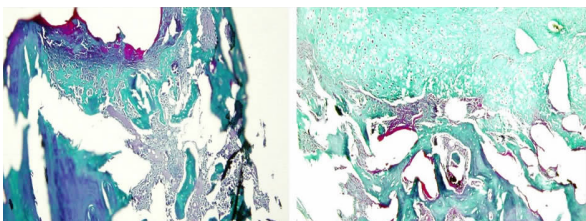
(a) 实验组 (b) 对照组

图 2 21 天 X 线片



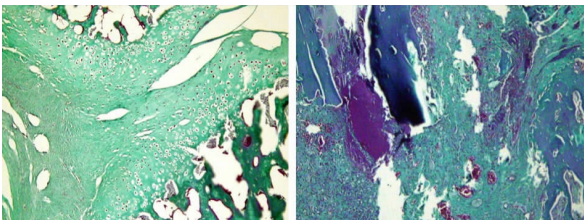
(a) 实验组 (b) 对照组

图 3 7 天 masson 三色染色 (×100 倍)



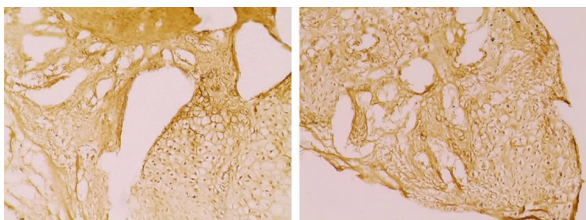
(a) 实验组 (b) 对照组

图 4 14 天 masson 三色染色 (×100 倍)



(a) 实验组 (b) 对照组

图 5 21 天 masson 三色染色 (×100 倍)



(a) 实验组 (b) 对照组

图 6 7 天原位杂交 (×40 倍)

7) X 线摄片
大鼠于术后第 7、14、21、28 天拍 DR 片,观察骨折愈合情况。
8) 数据处理及统计学分析
最后得到实验数据 FGFR3 阳性细胞的百分率,采用 SPSS19.0 软件进行数据处理,所有实验数据均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,样本均数间比较采用 t 检验, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 失神经对骨折愈合的影响

不同时间点的 X 线显示:脊髓损伤组明显比单纯骨折组愈合快,骨痂也较后者大(见图 1、2)。组织学观察见图 3~5,实验组较对照组可见大量的肥大软骨细胞及软骨细胞池,细胞排列比较紧密,细胞间基质明显减少,类骨质较多。失神经组骨小梁排列较为紊乱。

3.2 失神经对 FGFR3 表达的影响
不同时间点,每个标本随机选取一张原位杂交切片,每个时间点共 8 张切片,随机计数 5 个高倍视野(1000 个细胞),在光镜下观察 FGFR3mRNA 阳性细胞数目(图 6),计算阳性细胞比率,FGFR3mRNA 阳性细胞的细胞浆染色呈现出棕黄色,结果见表 1。

表 1 FGFR3mRNA 阳性细胞数百分比(%)		
组别	实验组	对照组
术后 3 天	1.21 ± 0.38	2.11 ± 0.33
术后 5 天	33.71 ± 1.00	39.39 ± 1.22
术后 7 天	89.24 ± 0.87	96.61 ± 2.32
术后 14 天	4.03 ± 0.25	5.72 ± 0.59
术后 21 天	2.23 ± 0.32	3.17 ± 0.31
术后 28 天	0.02 ± 0.01	0.11 ± 0.04

4 讨论

4.1 失神经骨折的愈合过程

骨折的重建是一个完全性再生过程,根据骨的

来源不同,可分为膜内成骨和软骨内成骨^[7]。膜内成骨好发生于不规则扁平骨,如颅骨、肩胛骨等。软骨内成骨好发生于四肢长骨。骨折愈合过程中分五个时期:炎症期、血肿机化期、软骨痂形成期、硬骨痂形成期和塑性期,单纯的骨折为二期愈合,而失神经骨折由于下肢失去功能而呈现一期愈合。许多学者^[8]已经证实脊髓损伤是一个复杂的病理过程,失神经后骨痂中神经生长因子及相关的神经肽类物质减少,而这些因子对骨折的愈合起着重要作用。通过 X 片我们发现,骨折后 7 天,实验组与对照组骨折线明显,骨折断端并无明显生长,实验组骨折端的模糊阴影较对照组明显,密度影增高;术后 14 天,失神经组骨折线已经模糊,骨折对合良好,骨折线两侧的骨痂影较大,而单纯骨折组骨折线清晰,能观察到骨折端内的骨痂影;术后 21 天,失神经组骨折线基本已经消失,骨折线两侧形成一个骨膨大,较对照组明显。在 Masson 染色上发现,术后 7 天,失神经骨折组的类骨质明显较单纯骨折组多,骨痂排列紊乱,失神经后骨折 7 天,纤维骨痂及软骨骨痂较单纯骨折组明显,更进一步从形态学上解释了失神经后骨折愈合加速,类骨质较对照组多,同时,骨折断端的骨量较多,骨断端连接处更为紧密。

王永红等^[9]证实失神经骨折后 14 天,骨痂的数量明显增多,骨痂的湿重较单纯骨折组明显大。软骨痂直径较单纯骨折大,硬骨痂直径较单纯骨折小,骨折愈合加速,这与我们在取标本时观察一致,并且在组织学上,我们也发现,失神经骨折处骨痂整体较大,骨小梁排列紊乱,患肢的生物力学也明显下降,并且不同时间点 HE 染色发现,软骨细胞个数明显比对照组少,且肥大软骨细胞增多,软骨陷窝明显增多(见图 3~6)。也有学者发现,脊髓损伤后早期形成大量纤维骨痂和软骨骨痂,骨痂中神经肽免疫阳性神经纤维较少,明显增厚的骨膜内层骨祖细胞、幼稚的软骨细胞胞质内 CGRP、GAL、NPY 强阳性表达;晚期骨痂中神经肽含量较低,编织骨形成少,认为正常大鼠骨生长活跃区有丰富的肽能神经支配,脊髓损伤后骨痂中神经肽有显著改变,并引起骨痂量和质的改变,推测神经因素参与调节骨折愈合,一方面影响骨折的重建,另一方面可能影响其他一些蛋白的表达。

4.2 失神经对 FGFR3 表达的影响

本实验发现 FGFR3 在骨折处的表达具有一定

的时间特异性和空间特异性(见图 7)。该受体主要在软骨细胞中表达,主要发生在从炎症机化期到纤维骨痂形成期骨折愈合过程中,无论在实验组还是在对照组都得到了进一步的证实。并且通过计数不同时期 FGFR3mRNA 阳性细胞的个数发现,二者的差异也具有统计学意义,进一步说明了神经影响 FGFR3mRNA 的表达,并且 FGFR3mRNA 阳性细胞个数在第 7 天达到高峰,而术后一周脊髓损伤处于水肿消退期,如果能在这一时期阻断 FGFR3mRNA 的表达,有助于临床上骨折的愈合。

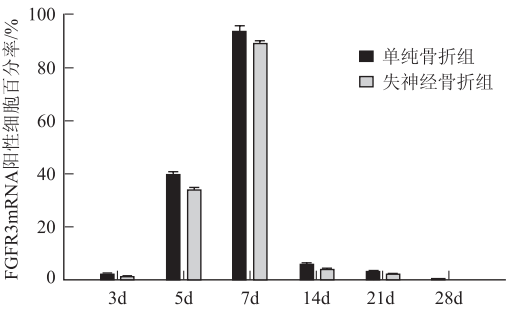


图 7 FGFR3 不同时间点的相对表达

脊髓损伤是一个复杂的病理过程,其中神经因子也参与了骨折的愈合,本实验证明了失神经后 FGFR3mRNA 表达的变化,但是参与神经损伤后骨折愈合的影响因子特别多,具体是哪一种影响因子还不确定,这正是本实验的不足之处。上文已经表述,这可能与神经相关肽有关,但具体的机制有待进一步验证。

有学者^[10]通过基因敲除 FGFR3 和 PTHrP 的小鼠发现,降钙素基因相关肽与 FGFR3 的表达能够协同促进骨的生长,促进软骨细胞池的增深,失神经后该物质明显增加。Yamanaka 等^[11]研究发现,FGFR3 突变导入 ADTC5 细胞中可致 PTHrPmRNA 表达下调,并诱导细胞凋亡。吴卓等^[12]在失神经骨折研究中发现,细胞的凋亡伴随着整个骨折愈合过程。失神经后可能通过抑制 FGFR3 的表达,从而使降钙素基因相关肽表达增加来促进骨折的愈合,这可以为临床提供参考价值,通过降钙素基因相关肽类,一方面促进神经的修复,另一方面促进骨折的愈合。

综上所述,FGFR3 的表达变化是失神经后的一个重要变化,研究二者之间的关系有助于临床上解决失神经骨折后骨折和神经的修复问题,并进一步探讨具体的神经因子与 FGFR3 的关系及具体的作

(下转第 1106 页)

行量化处理,获取实际样本数据也具有一定困难,故本文仅选取了工人工资等 8 个变量进行预测分析。如何引入更多变量,以完善煤炭物流成本预测指标体系需要做进一步研究。

参考文献

[1]董洁芳,王强,张小雷,等. 中国煤炭消费增长影响因素的多层次指数分解[J]. 中国科学院大学学报,2016,22(2):162-169.

[2]巩建信. 用目标管理法管控煤炭企业成本[J]. 煤炭经济研究, 2015,16(11):70-73.

[3]周亚蕊. 我国煤炭企业物流成本控制的有效途径选择研究[J]. 价格月刊,2014,13(9):89-91.

[4]王法中. 基于神经网络的煤炭企业物流成本预测[D]. 青岛:山东科技大学,2007.

[5]余建胜,路占元. 煤炭企业物流成本控制的研究[J]. 物流科技, 2007,12(9):108-110.

[6]王森. 煤炭企业物流成本控制探究[J]. 物流技术,2012,23(6):190-192.

[7]张文英,刘明亮. 煤炭企业原煤生产成本影响因素探析[J]. 财会

与审计,2008,12(4):68-71.

[8]陈龙涛,路世昌,邵晓红,等. 基于主成分回归分析的煤炭物流成本预测研究[J]. 资源开发与市场,2015,31(6):641-644.

[9]张瑾,卢国斌. 基于主成分 Fisher 判别分析的矿井通风系统安全评价[J]. 世界科技研究与发展,2013,35(4):501-504.

[10]杨拉蒂,毕建武,贾进章. 基于主成分回归分析的瓦斯含量预测[J]. 世界科技研究与发展,2013,35(6):694-696.

[11]FREUND Y. Boosting a weak learning algorithm by majority[J]. Information and computation,1995,121(2):256-285.

[12]LIU H,TIAN H,Li Y,et al. Comparison of four Adaboost algorithm based artificial neural networks in wind speed predictions[J]. Energy Conversion and Management,2015,92:67-81.

[13]ALFARO E,GARCIA N,GAMEZ M,et al. Bankruptcy forecasting: An empirical comparison of Adaboost and neural networks[J]. Decision Support Systems,2008,45(1):110-122.

[14]ACHARYA U R,FAUST O,KADIR N A,et al. Automated identification of normal and diabetes heart rate signals using nonlinear measures[J]. Computers in biology and medicine,2013,43(10):1523-1529.

(上接第 1083 页)

用机制。FGF 与 FGFR 的信号通路非常复杂,并且可能与某些神经因子具有交叉,涉及一些基因、蛋白的合成过程,如果进一步加以干预,有助于解决临床上许多难题。

参考文献

[1]TURKER M,ASLAN A,CIRPAR M,et al. Histological and biomechanical effects of zoledronate on fracture healing in an osteoporotic rat tibia model[J]. Eklem Hastalik Cerrahisi,2016,27(1):9-15.

[2]THORMANN U,EL K T,RAY S,et al. Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats[J]. Injury,2014,45(3):487-493.

[3]WANG X,QI H,WANG Q,et al. FGFR3/fibroblast growth factor receptor 3 inhibits autophagy through decreasing the ATG12-ATG5 conjugate,leading to the delay of cartilage development in achondroplasia[J]. Autophagy,2015,11(11):1998-2013.

[4]FOLDYNOVA-TRANTIRKOVA S,WILCOX W R,KREJCI P. Sixteen years and counting: the current understanding of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) signaling in skeletal dysplasias[J]. Human Mutation,2012,33(1):29-41.

[5]L'HOTE C G,KNOWLES M A. Cell responses to FGFR3 signalling;

growth, differentiation and apoptosis [J]. Experimental Cell Research,2005,304(2):417-431.

[6]马骞. 脊髓完全性损伤大鼠胫骨骨折愈合的实验研究及神经生长因子对失神经骨折愈合的影响[D]. 上海:第二军医大学,2006.

[7]WAGNER E F,KARSENTY G. Genetic control of skeletal development[J]. Current Opinion in Genetics & Development,2001,11(5):527-532.

[8]ALVES C J,NETO E,SOUSA D M,et al. Fracture pain-Traveling unknown pathways[J]. Bone,2016,85:107-114.

[9]王永红,汪玉良,吴卓,等. 失神经对大鼠胫骨骨折愈合影响作用的实验研究[J]. 世界科技研究与发展,2015,37(2):163-167.

[10]AMIZUKA N,DAVIDSON D,LIU H,et al. Signalling by fibroblast growth factor receptor 3 and parathyroid hormone-related peptide coordinate cartilage and bone development[J]. Bone,2004,34(1):13-25.

[11]HARADA D,YAMANAKA Y,UEDA K,et al. Sustained phosphorylation of mutated FGFR3 is a crucial feature of genetic dwarfism and induces apoptosis in the ATDC5 chondrogenic cell line via PLC-gamma-activated STAT1[J]. Bone,2007,41(2):273-281.

[12]吴卓,赵敏,王永红,等. 细胞凋亡在失神经骨折愈合过程中的作用机制[J]. 中国矫形外科杂志,2014,(22):2083-2088.