

转化生长因子₁在骨折愈合过程中的表达

史伟宾¹ 杜宁¹ 符诗聪¹ 程枫² 张凤华¹ 金晓龙³

(1. 上海第二医科大学附属瑞金医院 上海市伤骨科研究所, 上海 200025; 2. 上海第二医科大学生物化教研室, 上海; 3. 上海第二医科大学附属瑞金医院病理科, 上海)

【摘要】 目的 从分子水平认识转化生长因子₁(TGF₁)在骨折愈合过程中的作用。方法 采用地高辛(DIG)标记寡核苷酸探针的原位杂交方法,光镜观察成年新西兰白兔桡骨中段骨折愈合过程中,TGF₁、mRNA在骨痂区各组织细胞中的表达变化情况。结果 在骨折愈合早期,可见少量TGF₁表达阳性的单核细胞、间充质细胞和血管内皮细胞。在膜内成骨期,TGF₁在成骨细胞内有显著表达,尤其是多角形丰满成骨细胞。在成软骨期,较成熟软骨细胞内有较高表达。在软骨内成骨期,成骨细胞内有高表达,而在肥大的软骨细胞内几乎无表达。结论 TGF₁在整个骨折愈合过程中的每个阶段都具有重要作用,影响着细胞分化、增殖与成熟以及基质的形成。

【关键词】 转化生长因子₁ 骨折愈合 原位杂交

Expression of transforming growth factor₁ during fracture healing SHI Wei-bin, DU Ning, FU Shicong, et al. Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University Shanghai Institute of Traumatology and Orthopaedics (Shanghai, 200025)

【Abstract】 **Objective** To investigate the role of transforming growth factor₁(TGF₁) in fracture healing on the molecular level. **Methods** The local expressions of TGF₁ in callus during the process of healing of adult New Zealand white rabbits were investigated through optical microscope, using in situ hybridization of DIG labeled oligonucleotide probe. **Results** At the early stage of fracture healing, TGF₁、mRNA were presented in a few monocytes, mesenchymal cells, and endothelial cells. At the stage of intramembranous bone formation, TGF₁ expressed notably in the osteoblasts, especially in the multiangle plentiful osteoblasts. At the stage of chondrogenesis, nearly mature chondrocytes were strongly positive. While at the stage of endochondral ossification, the hypertrophic chondrocytes were almost negative. TGF₁ expressed strongly in osteoblast at this stage. **Conclusion** TGF₁ acted as an important role in every stage of fracture healing by affecting the differentiation, proliferation, maturation of cells and the formation of matrix.

【Key Words】 Transforming growth factor₁ Fracture healing In situ hybridization

转化生长因子₁是一种多能的、作用广泛的细胞因子,对骨折愈合也具有重要调节作用。本实验采用DIG标记寡核苷酸原位杂交方法观察家兔骨折愈合过程中,转化生长因子₁(TGF₁)的时空表达模式。RNA表达的变化,虽然不代表蛋白质的变化情况,然而它确是该蛋白基因激活、开放关键的第一步。了解TGF₁mRNA表达的变化,并与先前的免疫组化、Northern印迹、原位杂交研究等结果作对照分析,有助于从分子水平认识TGF₁在骨折愈合过程中的作用,为从分子水平干预骨折愈合以及了解组织细胞的起源、分化和归宿等提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物模型与组织切片的制作

健康成年新西兰白兔8只,作双侧桡骨骨折模型^[1],术后3天、5天、10天和15天处死取材,每次2只,骨痂组织取下后,焦磷酸二乙酯(DEPC)水配制的磷酸缓冲液(PBS)冲去血迹,迅速置液氮内冻存,然后在冰冻切片机上,用钨钢刀(德国,Leica),作5μm的连续冰冻切片,置预先硅化的涂有多聚赖氨酸的载玻片上,4%多聚甲醛(含0.1mol蔗糖的0.1mol PBS, pH7.2,配制)室温下固定15分钟, PBS洗2次,各10分钟。0.2mol HCl室温下作用10分钟,0.1% Triton X-100作用15分钟,含0.2%甘氨酸的PBS室温下孵育10分钟,蛋白酶K消化15分钟,

含 0.2% 甘氨酸的 PBS 室温下再孵育 10 分钟, PBS-5mmol MgCl₂ 洗 2 次, 各 15 分钟, 然后逐级酒精脱水, 空气干燥。

1.2 原位杂交

试剂: DIG 3 末端寡核苷酸标记试剂盒和检测试剂盒 (Boehringer Mannheim 公司); 顺丁烯二酸 (maleic acid) 和鲑鱼精 DNA (Sigma 公司)。所有试剂均由 DEPC 水配制。

寡核苷酸探针序列: CTTGCTGTACTGTGTGTCCTAA, 由 DNA 合成仪合成。

实验器皿均用 DEPC 水浸泡, 高压消毒灭菌, 玻璃器皿 250℃, 2h 烘烤灭活 RNA 酶。载玻片经去污、去油、酸洗后, 涂以多聚赖氨酸备用。

探针标记: 参照德国 Boehringer Mannheim 公司 DIG 3 末端寡核苷酸探针标记试剂盒所附说明。

原位杂交: 参照德 Boehringer Mannheim 公司 DIG 标记杂交检测试剂盒所附说明。简述如下: 预杂交: 滴加约 0.5ml 预杂交液 (4 × 标准柠檬酸盐溶液 (SSC), 40% 甲酰胺, 1 × Denhardt 杂交封闭液, 5% 硫酸葡聚糖, 250μg/ml tRNA, 250μg/ml 变性鲑鱼精 DNA), 室温 1 小时。杂交: 预杂交液中加 1μg/ml 标记探针, 取 50~100μl 杂交液滴加于切片上, SSC 液湿盒内, 37℃, 20 小时左右。杂交信号检测: SSC 洗去未杂交的探针; 缓冲液 洗涤 15 分钟; 缓冲液 (含 2% 绵羊血清), 室温 30 分钟; 滴加 1:1500 地高辛抗体 (缓冲液 内含 0.1% 绵羊血清, 1:1500 抗体), 室温, 2 小时; 缓冲液 洗 15 分钟 × 2, 缓冲液 洗 3 分钟; 氮蓝四唑 (NBT) 37℃ 暗处显色 3~5 小时; HE 复染, 镜下观察细胞胞质内有无蓝紫色或蓝色阳性杂交颗粒。

检测对照: (1) 杂交液中不加标记探针; (2) 杂交前以 RNase 处理切片。

2 结果

不脱钙骨痂组织切片基本能保持形态结构的完整, 杂交信号清晰。

在骨折愈合早期 (骨折后 3 天), 主要为血肿及部分肉芽组织, 血肿内以无核的红细胞为主, 之间可见杂交阳性颗粒 (图 1), 由于细胞在 5μm 的切片上还有层叠, 无法对颗粒作具体的定位, 偶见胞质含杂交阳性颗粒的单核细胞、间充质细胞以及血管内皮细胞。在膜内成骨期、软骨形成早期 (骨折后 5 天), TGF₁ 在骨膜下成骨细胞、软骨小岛内的软骨细胞及血管内皮细胞内均有表达, 增殖中的成骨细胞以

及接近成熟的软骨细胞尤为明显。

在软骨形成期 (骨折后 10 天), TGF₁ 在进一步扩大的软骨小岛的软骨细胞内持续高表达 (图 2)。

骨折后 15 天, 进入软骨内成骨期, 软骨细胞逐渐肥大, 软骨组织也开始为骨组织所替代, 肥大的软骨细胞显现弱杂交阳性信号, 成骨细胞多呈阳性, 且以丰满多角形的成骨细胞尤为显著。

3 讨论

转化生长因子 (TGF) 起先从血小板中取得, 因能使大鼠肾脏成纤维细胞发生表型转变而得名, 已知至少有 5 种异构体。本实验选择 TGF₁, 是因为对此异构体的研究比较多, 便于作对照比较。

许多细胞都能分泌 TGF₁, 如成骨细胞、成纤维细胞、巨噬细胞和软骨细胞等。同时, 大多数细胞都具有其作用受体, 可见其作用的广泛。它是成纤维细胞、成骨细胞的促有丝分裂原, 能调节基质蛋白的合成, 并参与胚胎期骨形成与生产发育。在创口愈合、骨折愈合过程中, 起重要作用。新生大鼠股骨骨膜下注射 TGF 后可刺激软骨产生和新骨形成^[2]。

本实验结果与有关研究基本一致^[3]。

在骨折愈合早期, 主要由血小板脱颗粒 (颗粒) 释放 TGF₁, 这些 TGF₁ 对骨折愈合过程的启动, 起至关重要的作用。而表达 TGF₁ 的细胞 (如 Andrew 等^[3]所报道的间充质细胞、血管内皮细胞以及公认的巨噬细胞、单核细胞等^[4]) 在本实验中则较少看到, 这可能与取材部位有关, 因为本实验在愈合早期仅取骨折间隙的血肿和相邻骨膜, 在制作切片的过程中, 又可能会导致部分感兴趣区域的丢失。而另一种可能是, 由于由血小板脱颗粒所释放的 TGF₁ 已达到了相当的浓度, 抑制了有关细胞 TGF₁ 的合成、释放。

在骨折愈合过程中, 膜内成骨先于软骨内成骨, 在骨折愈合早期, 便有骨折端骨膜反应, 由骨膜生发层细胞分化、增殖而形成成熟的成骨细胞。TGF₁ 在此时在生发层细胞及成熟成骨细胞内均有表达, 说明其对骨膜生发层细胞定向分化为成骨细胞以及成骨细胞的成熟起重要作用。

软骨形成期与膜内成骨期有重叠, 软骨小岛形成较早, 其间的软骨细胞或未成熟的软骨细胞样间充质细胞均有 TGF₁ 的表达, 并随软骨细胞的成熟、肥大而衰减。

骨折愈合大部分的骨性骨痂来自软骨内成骨, 在软骨小岛形成、扩展的同时, 部分成熟软骨细胞便

开始肥大,取而代之的是随血管进入的成骨细胞和由它形成的幼稚骨组织即编织骨。TGF β_1 的表达随软骨细胞成熟、肥大而衰减的同时,此时又在成骨细胞内旺盛分泌,刺激着骨基质的形成、沉积,直至骨性愈合。

Joyce 等^[2]的研究显示:TGF β_1 在软骨内成骨期对 I 型胶原的合成无作用,甚至具有抑制作用,而明显促进 II 型胶原基因的表达。体外研究也显示它能刺激较成熟软骨细胞前体细胞表达 I 型胶原、合成其它基质蛋白,而对成熟的软骨细胞具有抑制 I 型胶原合成而促进 II 型胶原合成的作用。这可能是由于不同细胞或同一种细胞的不同分化阶段对 TGF β_1 的反应不同所致。此现象也说明 TGF β_1 可能对软骨内成骨这一组织转化过程具有重要的调节作用,也将部分解释有关报道^[5]和我们前期研究^[6]所发现的软骨内成骨早期 II 型胶原基因在成骨细胞和肥大软骨细胞内共有表达的现象。

同时,这也进一步说明在软骨内成骨过程中,进行成骨活动的,除了传统认为的随血管进入的成骨细胞外,肥大的软骨细胞很可能也是重要的一员,它除了表达某些成骨细胞表型外,还存在向成骨细胞转化的趋向,而从此时 TGF β_1 的表达情况分析,它可能就是这种共有表型表达现象以及转分化现象的重要作用因子之一。

纵观骨折愈合过程,从血肿形成、机化、膜内成骨、软骨形成至软骨内成骨,TGF β_1 的表达,始终追随不同时期的主导细胞,可见 TGF β_1 对骨折愈合的重要作用。

研究 TGF β_1 这类细胞因子在骨折愈合过程中的表达的变化,有利于从分子水平了解骨折愈合的调控机制,为从分子水平干预骨折愈合提供了理论依据。

(本文图 1~2 见插页第 1 页)

参考文献

[1] 柴本甫,过邦辅.理气药物对骨折愈合影响的初步研究.中华外科杂志,1962,(5):299.
 [2] Joyce ME, Jingushi S, Bolander ME. Transforming growth factor- β_1 in the regulation of fracture repair. Orthop Clin North Am, 1990, 21(1):199.
 [3] Andrew JG, Hoyland J, Andrew SM, et al. Demonstration of TGF β_1 mRNA by in situ hybridization in normal human fracture healing. Calcif Tissue Int, 1993, 52(2):74.
 [4] Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, et al. Wound macrophages express TGF β and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. Science, 1988, 241(4866):708.
 [5] Hughes SS, Hicks DG, O Keefe RJ, et al. Shared phenotypic expression of osteoblasts and chondrocytes in fracture callus. J Bone Miner Res, 1995, 10(4):533.
 [6] 史炜镛,杜宁,程枫,等.不脱钙冰冻骨组织切片原位杂交.中华外科杂志,1999,37(3):132.

(收稿:1998-11-06 修回:1999-04-13 编辑:房世源)

短篇报道

四肢洗方治疗骨折后关节肿胀僵硬

盛春生 熊永春
 (含山县人民医院,安徽 含山 238100)

我科用四肢洗方治疗骨折后关节肿胀僵硬 86 例,疗效满意,现报告如下。

1 临床资料

本组 86 例中男 47 例,女 39 例;年龄 6~73 岁;膝关节部位肿胀、僵硬 18 例,腕关节 23 例,踝关节 21 例,肘关节 17 例,肩关节 7 例;患者大多有近关节部位或关节内骨折,及使用有牵引后缺乏关节的主动活动造成;经 X 线摄片示骨折基本愈合,对位对线满意,关节内未见游离体及关节间隙的明显改变,局部骨质略见疏松。

2 治疗方法

药物组成:桑桂枝各 15g,川红花 12g,川牛膝 15g,乳没各 15g,川木瓜 15g,羌独活各 15g,川萆 12g,当归 15g,海桐皮 15g,补骨脂 15g,川续断 15g,川芎 15g,威灵仙 15g,透骨草 20g,伸筋草 20g,秦艽 12g,艾叶 20g。以上药物以纱布包裹,加水 1500ml 煮沸后约保持 50~60 时,将药袋置于肿胀、僵硬的关节部位,再以药液熏洗患处,每次 15~30 分钟,每日 2~3 次。药液保留每

付药物可连续使用 3 天。另再辅以手法被动活动关节以及关节积极主动的功能锻炼。常规用药最多 15 付,最少 3 付。

3 治疗结果

疗效标准:痊愈:关节肿胀疼痛消失,各方向功能活动均未见明显受限。好转:肿胀疼痛明显减轻,关节功能明显改善,可从事日常工作。无效:关节僵硬、肿胀无明显改善。

结果:痊愈 58 例,好转 27 例。无效:3 例。

(编辑:连智华)

转化生长因子 β_1 在骨折愈合过程中的表达

(正文见 453 页)

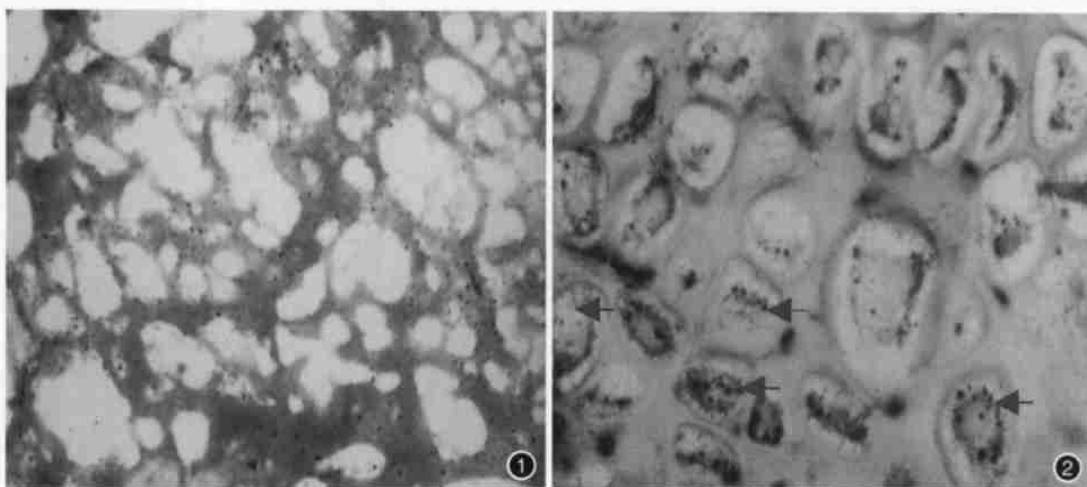


图 1 在骨折愈合早期(骨折后 3 天), 水肿内以无核的红细胞为主, 细胞之间可见杂交阳性颗粒。DIG 标记寡核苷酸原位杂交法 HE 复染 $\times 400$ **图 2** 在软骨形成期(骨折后 10 天), TGF β_1 在进一步扩大的软骨小岛的软骨细胞内持续高表达(箭头所示)。DIG 标记寡核苷酸原位杂交法 HE 复染 $\times 400$

中药胶剂修复半月板损伤的实验研究

(正文见 456 页)

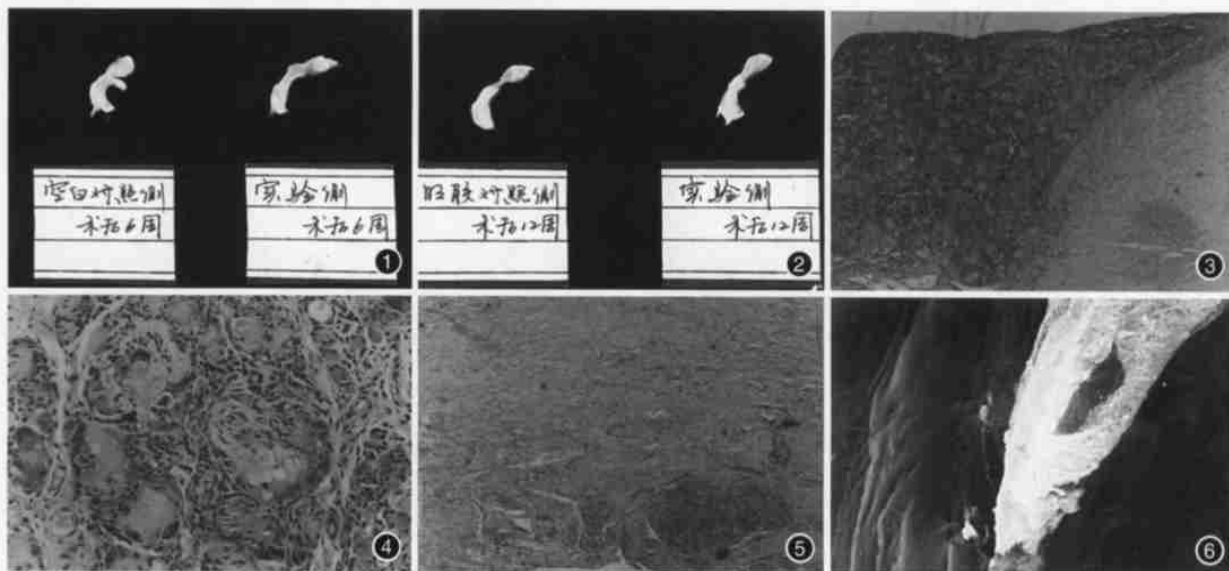


图 1 术后 6 周, 大体观察见实验组半月板裂隙已被肉芽样修复组织完全填充。**图 2** 术后 12 周, 大体观察见实验组半月板已基本修复。**图 3** 术后 6 周, 实验组, 见半月板裂隙已被肉芽样修复组织完全填充, 创缘附近的正常半月板组织有纤维软骨细胞增殖现象。HE 染色 $\times 4$ 。**图 4** 术后 6 周, 实验组, 修复组织内已有血管长入, 有成纤维细胞及一种均质无结构状物, 周围有许多吞噬细胞包裹, 并逐渐被吞噬细胞分割、吞噬, 演变为纤维结缔组织。HE 染色 $\times 20$ 。**图 5** 术后 24 周, 实验组, 修复组织已经演变为纤维软骨组织, 仅在裂伤区游离缘局部还残留了一小部分均质无结构状物处在机化、吸收过程中。HE 染色 $\times 4$ 。**图 6** 术后 24 周, 实验组半月板的修复组织与周围正常半月板组织愈合良好, 外观与周围正常的半月板组织十分相似, 呈平行的波浪形丘状峰。而在原裂伤部游离缘处, 修复组织的局部区域在形态上与周围区域的修复组织及正常半月板仍有所区别。扫描电镜观察, 15KV, $\times 300, 1000\mu\text{m}$ 。