

# TGF 1 mRNA 在颌骨骨折愈合过程中的表达及意义

司晓辉 金 岩 杨连甲 George L. Tipoe Frank H. White

**摘要** 为了进一步探讨 TGF 在骨生长和骨愈合中的作用,建立了颌骨骨折愈合的动物模型,利用原位杂交方法检测骨折愈合过程中 TGF 1 mRNA 的表达。结果发现,在骨折愈合过程中的软骨形成和膜内骨骨化阶段,TGF 1 的转录水平较高,在膜内成骨时转录水平较低,而在伤后即刻反应阶段无 TGF 1 的转录。说明 TGF 在骨折修复过程中最初的形态发生,随后的细胞增殖及最终的组织重建中起着重要的作用。

**关键词** 转化生长因子 骨折愈合 原位杂交

骨折修复过程是组织再组的过程,与一般组织修复不同的是它不遗留瘢痕。骨折后其修复过程立即开始,并受全身及局部因素的调节,其中局部诱导、调节因子对于细胞的趋化、聚集、分化和增殖起着重要的作用<sup>1</sup>。转化生长因子(transforming growth factor, TGF)是这些因子中愈来愈受到重视的一种调节因子。TGF 是一种具有同源双链的 25 kDa 的多肽,在骨基质中的含量极为丰富(0.3 mg/kg),已有实验证实,TGF 对间充质细胞、软骨细胞、成骨细胞和破骨细胞均有不同程度的调节作用<sup>2,3</sup>,在骨形成和骨重建过程中起关键作用。为了进一步了解 TGF 在骨生长和骨愈合中的调节作用,建立了骨折愈合的动物模型并用原位杂交方法检测骨折愈合不同时期 TGF 1 mRNA 的表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 骨折模型的建立

参照金岩等<sup>4</sup>方法建立颌骨骨折模型。选健康成年雄性家兔 22 只(1.6~2.2 kg),在 3%戊巴比妥钠(1 ml/kg)全麻下,在一侧下颌角前切迹处用牙科涡轮机造成完全性骨折。钢丝结扎固定,逐层缝合骨膜、肌肉和皮肤。

### 1.2 取材及标本处理

分别取术后第 1,3,5,7,11,14,21,28 d(除 21 和 28 d 各为 2 只动物外,其余各时间点均为 3 只动物)动物标本在 4%多聚甲醛内固定后,取骨折断端及周围组织并修整标本,后固定 4 h(4℃),经常规脱钙、石蜡包埋,切片 4 μm 厚,捞于涂胶玻片,60℃烘烤过夜。整个操作过程戴手套,严防 RNase 污染。

### 1.3 原位杂交<sup>5</sup>

Human TGF 1 Oligonucleotide Probe 购自 Oncogene Science 公司,探针的标记按照 DIG-Oligo-3' End Labeling kit (BOEHRINGER MANNHEIM Biochemical) 进行。石蜡切片经常规脱蜡至 DEPC 水及 0.1 mol/L PBS(pH7.4),0.2 N HCl 20 min,蛋白酶 K37 消化 15 min,0.2%甘氨酸 10 min,4%多聚甲醛固定 30 min,梯度酒精脱水后 42℃杂交 20 h。2×SSC,1×SSC,0.5×SSC 依次充分洗涤,Buffer1(100 mmol/L Tris-HCl,150 mmol/L NaCl,pH7.5)洗后,用正常羊血清封闭,滴加 Anti-DIGAP(1:500),37℃孵育 2 h 后用 Buffer1, Buffer3(100 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L NaCl,50 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,pH9.5)充分洗涤,滴加显色液(NBT/BCIP),暗处显色 16 h 后用 TE(10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,pH8.0)充分显色以终止反

国家自然科学基金资助(批准号:39300148)

作者单位:710032 第四军医大学口腔医学院病理科(司晓辉,金岩,杨连甲),香港大学解剖学系(George L. Tipoe, Frank H. White)

应。常规脱水透明封片。

实验设阳性对照(骨肉瘤),略去探针的空白对照及 RNase 消化对照。

## 2 结 果

TGF 1 mRNA 阳性信号为细胞浆中出现蓝色颗粒。骨折后第 1 d,第 3 d 为伤后即刻反应阶段,骨折断端血肿内未见到阳性信号。骨折后第 5 d,第 7 d 为膜内骨形成阶段,骨断端增生的未分化间充质细胞,断端骨骨膜内散在分布的间充质细胞及新生骨小梁周围的成骨细胞可见阳性信号(图 1,2)。骨折后第 11 d 为软骨形成期,阳性细胞的数量及阳性信号的强度均增加。成骨细胞、骨细胞均见阳性信号,骨断端周围的软骨岛内几乎所有软骨细胞均显示较强的阳性信号(图 3,4),骨折后第 14 d 开始膜内骨钙化,成骨细胞、软骨细胞仍可见较强的阳性信号(图 5)。骨折后第 21~28 d 为改建期,骨组织逐渐成熟,细胞阳性率及阳性信号强度均减弱。

空白对照未见阳性信号,RNase 消化对照阳性信号明显减弱。

## 3 讨 论

骨内丰富的 TGF 和高亲合力的受体以及 TGF 刺激间充质细胞分泌胶原和软骨蛋白多糖,均提示了 TGF 与骨生长的密切关系。骨产生的 TGF 主要是 TGF 1。体内实验中,TGF 1 可启动骨和软骨的形成<sup>6</sup>,体外实验 TGF 1 可增强骨膜的软骨形成<sup>7</sup>。胚胎发育过程中,用免疫组化方法在软骨、骨及牙齿组织内均可检测到 TGF 1<sup>8</sup>,骨和软骨发育中,用原位杂交方法在成骨细胞和软骨细胞内均有 TGF 1 mRNA 的表达<sup>9</sup>。随着新的克隆探针及高灵敏度检测方法的出现,使人们能够从基因水平来了解骨折愈合过程中的调节因子。本实验结果显示,在骨折修复的软骨形成和膜内骨化阶段,TGF 1 mRNA 有高水平的表达,这与 Joyce 等<sup>10</sup> 的 Northern 印迹法结果相一致。此外,本实验显示了阳性信号主要位于成骨细胞和软骨细胞。在膜内骨形成阶段,TGF 1 mRNA 的水平较低。在血肿区则无 TGF 1

mRNA 的表达,但免疫组化结果显示在血肿区有较强的阳性信号,提示这时的 TGF 1 是由血肿区的小血小板释放出来的,而不是由骨折区的细胞合成的。

综上所述,在骨折发生后,血肿区的小血小板释放高浓度的 TGF,在以后的修复过程中,成骨细胞,软骨细胞均合成并分泌 TGF,促进并调节成骨细胞、软骨细胞的增殖分化,从而调节骨组织的修复和重建。

当然,在骨折修复时局部生长因子之间的协同作用也不容忽视。在愈合的不同时期,尚有许多生长因子的共同参与,如 BMP,PDGF,bFGF 等。包括 TGF 在内的这些生长因子在骨折修复中各自发挥的作用以及相互关系还有待于进一步研究。

(本文图见中心插页 12)

## 4 参 考 文 献

- 1 Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factor. Clin Orthop, 1991;263 30
- 2 Rosen DM, Stempien SA, Thompson AY, et al. Transforming growth factor modulates the expression of osteoblast and chondroblast phenotypes in vitro. J Cell Physiol, 1988;134 337
- 3 Lind M, Deleuran B, Thestrup PK, et al. Chemotaxis of human osteoblasts. APMIS, 1995;103 140
- 4 Jin Y, Yang LJ, White FH. An immunocytochemical study of BMP in experimental fracture healing of the rabbit mandible. Chin Med Sci J, 1991;9 91
- 5 Crabb ID, Hughes SS, Hicks DG, et al. Nonradioactive in situ hybridization using digoxigenin-labeled oligonucleotides. Am J Pathol, 1992;141 579
- 6 Beck LS, Ammann AJ, Aufdemorte TB, et al. In vivo induction of bone by recombinant human transforming growth factor. J Bone Min Res, 1991;6 961
- 7 Miura Y, Fitzsimmons JS, Commisso CN, et al. Enhancement of periosteal chondrogenesis in vitro. Clin Orthop, 1994;301 271
- 8 Pelton RW, Saxena B, Jones M, et al. Immunohistochemical localization of TGF-1, 2 and 3 in the mouse embryo: Expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. J Cell Biol, 1991;115 1091

(下转第 204 页)

## Preliminary Study of the Use of the Epicardium of Calf in the Temporomandibular Jointplasty

Xue Guochu , Tan Shuliang , Li Xiuling , et al

*Guangdong Provincial Stomatological Hospital*

Cui Jianxing

*Guangdong Provincial Hospital*

### Abstract

The epicardium of calf is a kind of membrane in which the protein , fat and carlohydrate were put out. The membrane is easy to be sutured and its strength is good. The epicardium of calf has been used as the replacemnts of valves in heart surgery. There is no ideal method for the patients with ankylosis of TMJ at present. The authors used the epicardium of calf as greft that was placed between sections of mandibular bone. The membrane covered the section and limited the synostosis of bones. This article reported an observation on the clinical efficacy of treatment of 11 cases with ankylosis of TMJ , in which 10 patients were considered success , they could open the mouth 3 ~ 4 cm , one case was fail , because the area of operation was infected.

**Key words :** epicardium of calf    ankylosis of TMJ    temperomandibular jointplasty

(上接第 187 页)

9    Dodds RA , Merry K , Littlewood A , et al. Expression of mRNA for IL1 , IL-6 and TGF- 1 in developing human bone and cartilage. *J Histochem Cytochem* , 1994 ; 42 : 733

10    Joyce ME , Jingushi S , Bolander ME. Transforming growth factor- in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am* , 1990 ; 21 : 199

(1995 - 11 - 07 收稿)

## Expression of mRNA for TGF 1 in the Healing of Mandibular Fracture

Si Xiaohui , Jin Yan , Yang Lianjia

*Department of Oral Pathology , the Stomatological College of*

*the Fourth Military Medical University*

George L Tipoe , Frank H White

*Department of Anatomy , Hong Kong University*

### Abstract

The aim of present study is to investigate the action of TGF in regulating fracture repair. An experimental model of mandibular fracture healing was established to detect TGF 1 mRNA using digoxigenin labelled oligonucleotide probes for in situ hybridization. Positive signals were seen in cytoplasm. The results showed that osteoblasts and chondrocytes had high level of TGF 1 mRNA in the stage of chondrogenesis and endochondral ossification. During intramembranous bone formation , the transcription of TGF 1 was low. No positive signal was seen in the stage of immediate injury response. Present results indicated that TGF played an important role in the initial morphogenesis , subsequent differentiation and final reconstruction during the process of fracture healing.

**Key words :** transforming growth factor    healing of mandibular fracture    situ hybridization