

碱性成纤维细胞生长因子促进骨折愈合的作用及机制

尹慧君, 苏佳灿

(第二军医大学长海医院骨科, 上海 200433)

[摘要] 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是体内重要的创伤愈合因子之一。骨折后 bFGF 通过调控骨组织中细胞增殖及分化、增加骨折局部骨密度及促进局部血管生成来加速骨折的愈合。此外,随着对 bFGF 研究的不断深入,其在骨组织工程所展现出的对骨修复的作用将越来越受到人们的重视。

[关键词] 成纤维细胞生长因子 2;骨折愈合;信号传导

[中图分类号] R 683 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)03-0329-03

Role of basic fibroblast growth factor in promoting fracture healing and the related mechanism

YIN Hui-jun, SU Jia-can (Department of Orthopedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Basic fibroblast growth factor(bFGF) is one of the most important factors for wounds healing. bFGF promotes healing of bone fracture by regulating cell proliferation and differentiation of bone tissues, increasing local bone density, and accelerating local angiogenesis. With the progression of bFGF research, more and more attention will be paid to bone repair function of bFGF in bone tissue engineering.

[KEY WORDS] fibroblast growth factor 2; fracture healing; signal transduction

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(3): 329-331]

Hoftman 等于 1940 年从牛脑组织的抽提物中发现一种能够促进成纤维细胞生长的物质^[1]。1975 年该物质被分离纯化,因其 pH 值为 9.6 而被命名为碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)。20 世纪 90 年代,国内外相继运用基因工程方法成功获得重组 bFGF,有力推动了关于 bFGF 的研究。bFGF 广泛存在于人体各种组织中,在体内参与多种组织的创伤修复过程,是体内重要的创伤愈合因子之一^[2]。

1 bFGF 在骨折愈合过程中的作用

骨折愈合从组织学上可概括为血肿和炎症期、纤维性及骨性骨痂形成期和骨痂改建期等几个阶段。骨愈合实质是骨损伤后的再生过程,也是骨组织的形成过程。大量研究数据表明,无论在骨折愈合的哪个阶段, bFGF 都是骨细胞功能的重要调节者。

1.1 bFGF 对骨髓间充质干细胞(MSCs)的作用 骨折作为一种损伤启动了骨的修复机制,促使部分原始细胞发生分化、增殖,进而使骨组织得以修复。其中来源于骨髓基质中的一群干细胞即 MSCs 具有多种分化潜能,除能分化产生一些中胚层组织如骨、软骨、肌腱、肌组织、脂肪细胞外,还可分化成肝细胞、胰岛细胞、神经细胞和神经胶质细胞等内胚层和外胚层来源的细胞。在 MSCs 向成骨细胞定向分化的过程中,一些生长因子包括骨形态发生蛋白(BMPs)、转化生长因子、bFGF 等起了明显的促进作用。bFGF 主要通过刺激 MSCs 尤其是早期骨祖细胞的增殖,促进毛细血管增殖及向骨移植中植入,加快需要血供的软骨内骨化,从而增加成骨量并加快骨折的愈合^[3]。Lisignoli 等^[4]将骨髓源性 MSCs

在含有 bFGF 的成骨分化液中诱导后,与支架材料复合,植入小鼠桡骨中段的骨缺损处,含 bFGF 诱导后 MSCs 植入组第 40、80、160、200 天的放射学评分远远高于其他对照组;试验组第 40 天组织切片可见较多的新生骨生成,骨缺损区完全被新生骨组织充填,并可见板层骨;第 200 天骨缺损基本上完全修复,而对照组骨缺损还未完全被新生骨充填。

1.2 bFGF 对软骨细胞的作用 原位杂交显示在新分化的软骨细胞中有 I 型和 II 型胶原 mRNA 存在。待骨痂中软骨细胞成熟后 I 型胶原 mRNA 即消失。骨痂软骨随之扩大,通过间充质细胞分化为软骨细胞和软骨细胞增殖两种途径进行。研究发现 bFGF 可促进软骨细胞合成蛋白多糖、增强对细胞外基质的黏附及增加软骨细胞的增殖、分化作用。在光镜和电镜下均可以看到生长在含有 bFGF 培养液中的单层软骨细胞分泌的蛋白多糖较未加 bFGF 培养出单层软骨细胞分泌的蛋白多糖多,由此提示 bFGF 可促进软骨细胞合成蛋白多糖。Schmal 等^[5]研究发现含 bFGF 的软骨细胞显示了对 I 型和 II 型胶原蛋白、纤维结合蛋白及纤维蛋白原具有更强的黏附作用,黏附了这些蛋白后的软骨细胞能显著扩大自身的增殖效应。Wong 等^[6]发现在大鼠的股骨骨折中应用 bFGF 可明显增加软骨细胞的分化,并加速骨组织的形成。

1.3 bFGF 对成骨细胞的作用 成骨细胞起源于中胚层,在其表面存在着 FGF 受体(FGFR),成骨细胞合成 bFGF 通过旁分泌或自分泌释放到细胞外与 FGFR 结合,并通过相关信号转导途径可促使骨祖细胞分化为成骨细胞,进而诱导成骨

细胞分裂、增殖、合成骨基质。Pacicca 等^[7]研究发现 bFGF 能促进成纤维细胞和成骨细胞的增殖及胶原合成,进而提高骨痂的力学稳定性。Yu 等^[8]特异性地将 FGFR2 从即将发育为软骨和骨的间充质细胞中剔除,使条件小鼠能够成活;同时发现 FGFR2 在维持成骨前体细胞的增生以及成熟成骨细胞功能的维持中具有重要作用。Clarke 等^[9]通过用合成骨替代材料修复种植体周骨缺损,发现 bFGF 能抑制成骨细胞的分化,从而延缓破骨细胞进入局部骨质缺损区。

1.4 bFGF 能增加骨折局部骨含量及骨密度 骨痂建成后,骨折的断端仅被幼稚的、排列不规则的编织骨连接起来。为了符合人体生理要求而具有更牢固的结构和功能,编织骨进一步改建成为成熟的板层骨。在破骨细胞的骨质吸收及骨母细胞新骨质形成的协调作用下进行了骨的改建,即骨折骨所承受应力最大部位有更多的新骨形成而机械性功能不需要的骨质则被吸收。Kawaguchi 等^[10]研究发现,给予 bFGF 治疗的所有动物在伤后 6 周骨连接全部完成,而对照组在伤后 10 周仍有 40% 未完成;并且治疗组皮质骨含量和密度在伤后 6 周较对照组显著增加,提示 bFGF 对骨折已愈合的机械性能也有影响。Chen 等^[11]通过对兔的干骺端手术建立骨折模型,在骨折处局部注射 bFGF,结果发现 bFGF 有加速骨折愈合和增加骨折部位矿化密度的作用。Montero 等^[12]在 bFGF 基因敲除的小鼠表现出骨量的减少和骨矿化沉积的减低,提示 bFGF 在骨量的沉积和维持中的重要作用。

1.5 bFGF 对血管生成的作用 研究发现,人胫骨骨不连组织中软骨细胞的超微结构及功能是正常的,但血管数量减少、栓塞,缺乏足量钙质输送到断端的血供,导致软骨痂钙化障碍,是骨不连的真正原因。由此,设法改善骨折后断端血供状态是至关重要的。

bFGF 作为一种毛细血管增殖刺激剂能促使毛细血管向断端内以及移植物中长出,使骨修复早期的组织中软骨岛数量增多,并使断端骨痂和骨移植物中提前血管重建时限,从而促进了需要血供的软骨内化骨,加速了软骨痂的成熟和骨化。此外,bFGF 还能够通过上调血管内皮细胞生长因子(VEGF)的表达来促进移植骨的血管化,促进新骨形成^[13]。

2 bFGF 促进骨折愈合的可能信号转导途径

bFGF 是骨细胞发挥其作用及骨形成的重要调节者。近些年来,国内外研究主要集中在 bFGF 激活成骨细胞的信号转导通路,可能包括丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径^[14-16]、磷酸蛋白激酶(PKC)途径。另外,Debiais 等^[17]研究在人成骨细胞中 bFGF 诱导的磷酸肌醇三磷酸激酶/糖原合酶激酶-3(PI3K/GSK-3)信号转导通路可能是调控成骨细胞的数量和成骨作用的重要机制。

2.1 Ras/Raf/MAPK 途径 MAPK 现又被称为“ERK”(extracellular signal regulated kinase, 细胞外信号调节激酶),它是调节细胞增生、分化和凋亡的最基本信号途径。

Ras/Raf/MEK/ERK 途径是 FGFs 诱导多种细胞增殖的重要路径。bFGF 释放出胞外后,先与细胞表面的硫酸肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPG)结合,再

移至细胞表面,与 FGFR 结合形成一个类似三明治的结构。bFGF 与 FGFR 结合后促使 FGFR 形成二聚体,进而激活 FGFR 胞内段的酪氨酸激酶使其发生自身磷酸化,从而使 bFGF 的信号通过一系列细胞内蛋白质级联反应传递给细胞核。c-fos 等基因的转录开始启动,进而使细胞发生增殖和分化反应。在分子水平上,FGFR 至少含有 7 个磷酸化酪氨酸位点,主要分布在胞内近膜区和酪氨酸激酶区。衔接蛋白即成纤维细胞生长因子受体底物 2(FGFR substrate 2, FRS2)则能与多个磷酸化位点结合,进而产生 4 个 Grb2-Sos (growth factor receptor bound, Grb; son of sevenless, Sos)复合物的结合位点,并提供两个酪氨酸磷酸酶——Src 同源区 2 磷酸酶 2 (Src homology domain 2 phosphatase 2, SHP-2)的结合位点,使 SHP-2 能分别通过降低酪氨酸磷酸化水平和活化 Ras-MAPK 途径来对生长因子受体信号转导进行负调控和正调控。Grb2-Sos 介导表达 FGFR1 细胞中的 Ras 活化存在两种途径的意义有待发现^[18]。

2.2 PKC 途径 Tang 等^[19]在研究中发现 bFGF 通过依赖 PKC 通路而促进纤维结合蛋白的微纤维生成和骨形成。bFGF 通过免疫印迹法分析后证明能增加纤维结合蛋白的蛋白水平。PKC 的抑制剂能通过 bFGF 的作用对抗纤维结合蛋白蛋白量的增加。用 bFGF 处理过的成骨细胞增加了不同的 PKC 的亚型的膜转位,包括 α 、 β 、 ϵ 和 δ 。然而,用不同的 PKC 反义亚型处理后证明 α 、 β 同工酶在促进 bFGF 对纤维结合蛋白的聚集起到了很大的作用。据报道 $\alpha 5 \beta 1$ 与纤维结合蛋白(fibronectin, Fn)的微纤维生成作用相关,免疫细胞化学也证明用 bFGF 处理将增加 $\alpha 5$ 的群聚。流式细胞仪分析证明 bFGF 增加细胞表面表达 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$, 并和 bFGF 对抗 PKC 抑制剂的这种增殖。Fn 是特有的糖蛋白的双聚体,是细胞外基质的组成之一。在体外通过在胫骨干骺端插入套针局部给予 bFGF 后能显著提高松质骨小梁的 Fn 的蛋白水平,而同时服用 PKC 抑制剂却受到抑制。此外,bFGF 局部注射能增加继发的胫骨松质的骨容积,而在 PKC 抑制剂下,骨容积明显下降。这些结果说明 bFGF 能促进骨的形成和 Fn 的微纤维生成,无论在体内还是体外都经过依赖于 PKC 的转导通路。

2.3 PI3K/GSK-3 和依赖 β 连环蛋白的信号转导途径 bFGF 对成骨细胞凋亡的直接保护效应能被低血浆浓度所诱发出来,除了在成骨细胞分化的作用外,PI3K 出现并控制成骨细胞的存活。因为 bFGF 在成骨细胞中极低限度地刺激 PI3K,由 bFGF 诱导的细胞存活可能不是惟一与 PI3K 激活作用相关的。PI3K 是其中一个可能的激活 MAPK 下游的效应器,可能是 p38 MAPK 或 MEK-1 的抑制剂没有阻断 bFGF 诱导的半胱天冬酶 2 及 3 的作用,说明 MAPKs 并没有包括在 bFGF 在人成骨细胞中的对抗凋亡作用。其他激酶如 PKC 对成骨细胞的存活是由 bFGF 无时无刻的存在来调节的。我们可以说,在人成骨细胞中,bFGF 增加了 GSK-3 磷酸化,那被认为是阻止 GSK-3 的生物学活性的。这说明 GSK-3 可能起到控制成骨细胞生长并控制成骨细胞存活的作用。GSK-3 的磷酸化被认为导致细胞溶质 β 连环蛋白聚集和核转运,致使经过结合 Lef/Tcf 基因转录的激活来调控

基因。 β 连环蛋白的聚集及 Lef/Tcf 的转录是由于锂缺乏 bFGF 的残存效应促使成骨细胞发生凋亡。因此, GSK-3 及由 Lef/Tcf 介导转录的 β 连环蛋白起到了双重作用, 并发挥在由 bFGF 调控成骨细胞的凋亡上。我们认为依赖 bFGF 的 PI3K 信号转导途径将控制成骨细胞存活, 而依赖于锂转导通路将使 β 连环蛋白聚集和促进成骨细胞的凋亡^[19]。

3 结语及展望

随着对 bFGF 研究的不断深入, bFGF 对骨修复的作用也越来越受到人们的重视, 与其他因子之间的协同作用及量效关系也必将为人们所揭示。bFGF 及相关载体复合而成的骨修复材料已进入实验阶段。如 Fukuda 等^[20] 用 bFGF 联合由超高分子量的聚乙烯纤维形成的立体纤维结构的人工软骨以提高大片骨软骨细胞缺损的修复的实验中显示, 加入 bFGF 的人工软骨显著地加速了人工材料内部及周围关节软骨及软骨下骨组织的愈合, 并一定程度上改良了骨的生物力学的性质。作为骨组织工程的诱导因子, bFGF 通过调节细胞增殖、分化并改变细胞产物的合成而作用于成骨过程, 不仅能促进骨细胞的生长, 且能促进成骨细胞与支架材料的黏附。因此, 在骨组织工程中 bFGF 有广泛的应用前景。

[参考文献]

- [1] Gospodarowicz D. Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary[J]. *J Biol Chem*, 1975, 250: 2515-2520.
- [2] Musgrave D S, Fu F H, Huard J. Gene therapy and tissue engineering in orthopaedic surgery[J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2002, 10: 6-15.
- [3] Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolation from murine bone marrow by negative selection[J]. *J Cell Biochem*, 2003, 89: 1235-1249.
- [4] Lisignoli G, Fini M, Giavaresi G, et al. Osteogenesis of large segmental radius defects enhanced by basic fibroblast growth factor activated bone marrow stromal cells grown on non-woven hyaluronic acid-based polymer scaffold[J]. *Biomaterials*, 2002, 23: 1043-1051.
- [5] Schmal H, Mehlhorn A T, Fehrenbach M, et al. Regulative mechanisms of chondrocyte adhesion[J]. *Tissue Eng*, 2006, 12: 741-750.
- [6] Wong W C, Yu X, Wallace A L, et al. Use of a polymeric device to deliver growth factors to a healing fracture[J]. *ANZ J Surg*, 2003, 73: 1022-1027.
- [7] Pacicca D M, Patel N, Lee C, et al. Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis[J]. *Bone*, 2003, 33: 889-898.
- [8] Yu K, Xu J, Liu Z, et al. Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth[J]. *Development*, 2003, 130: 3063-3074.
- [9] Clarke S A, Brooks R A, Lee P T, et al. The effect of osteogenic growth factors on bone growth into a ceramic filled defect around an implant[J]. *J Orthop Res*, 2004, 22: 1016-1024.
- [10] Kawaguchi H, Nakamura K, Tabata Y, et al. Acceleration of fracture healing in nonhuman primates by fibroblast growth factor-2[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86: 875-880.
- [11] Chen W J, Jingushi S, Aoyama I, et al. Effects of FGF-2 on metaphyseal fracture repair in rabbit tibiae[J]. *J Bone Miner Metab*, 2004, 22: 303-309.
- [12] Montero A, Okada Y, Tomita M, et al. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation[J]. *J Clin Invest*, 2000, 105: 1085-1093.
- [13] Rabie A B, Lu M. Basic fibroblast growth factor up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor during healing of allogeneic bone graft[J]. *Arch Oral Biol*, 2004, 49: 1025-1033.
- [14] Suzuki A, Palmer G, Bonjour J P, et al. Stimulation of sodium-dependent phosphate transport and signaling mechanisms induced by basic fibroblast growth factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells[J]. *J Bone Miner Res*, 2000, 15: 95-102.
- [15] Tokuda H, Kozawa O, Uematsu T. Basic fibroblast growth factor stimulates vascular endothelial growth factor release in osteoblasts: divergent regulation by p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase[J]. *J Bone Miner Res*, 2000, 15: 2371-2379.
- [16] Chaudhary L R, Hruska K A. The cell survival signal Akt is differentially activated by PDGF-BB, EGF, and FGF-2 in osteoblastic cells[J]. *J Cell Biochem*, 2001, 81: 304-311.
- [17] Debais F, Lefevre G, Lemonnier J. Fibroblast growth factor-2 induces osteoblast survival through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent, -beta-catenin-independent signaling pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2004, 297: 235-246.
- [18] Boilly B, Vercoutter-Edouart A S, Hondermarck H, et al. FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000, 11: 295-302.
- [19] Tang C H, Yang R S, Huang T H, et al. Enhancement of fibronectin fibrillogenesis and bone formation by basic fibroblast growth factor *via* protein kinase C-dependent pathway in rat osteoblasts[J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 66: 440-449.
- [20] Fukuda A, Kato K, Hasegawa M, et al. Enhanced repair of large osteochondral defects using a combination of artificial cartilage and basic fibroblast factor[J]. *Biomaterials*, 2005, 26: 4301-4308.

[收稿日期] 2006-07-19

[修回日期] 2006-12-15

[本文编辑] 曹 静