

# 大鼠胫骨近端骨骺损伤后骨桥形成分子机制的研究

颀 强<sup>1)</sup> 胡蕴玉<sup>1)\*</sup> 杨 柳<sup>1)</sup> 雷 伟<sup>1)</sup> 朱庆生<sup>1)</sup>  
李明全<sup>1)</sup> 赵 黎<sup>2)</sup> 吕 荣<sup>1)</sup> 王 军<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>第四军医大学西京医院全军骨科研究所, 西安 710032; <sup>2)</sup>上海新华医院儿童骨科, 上海 200092)

**摘要** 利用胫骨近端干骺端骨骺损伤的大鼠动物模型, 研究骨桥形成的分子病理机制. 通过 Alcian blue 染色观察损伤模型的建立、损伤愈合过程以及骨桥形成情况. 采用 Tunel 试剂盒原位细胞凋亡检测, 了解损伤区及周围细胞凋亡情况. 利用免疫组织化学及原位杂交实验, 观察损伤区周围软骨细胞改变, 检测损伤区是否有软骨细胞生成, 检测 *Ihh* 以及 *Ptch1* 表达阳性细胞. 发现骨骺损伤骨桥形成过程中, 完全损伤区中心没有软骨细胞特异的因子 *Col2a1* 和 *Col X* 以及 *Ihh* 和 *Ptch1* 的表达, 但是完全损伤区和周围正常软骨交界间存在次损伤软骨区, 存在软骨细胞凋亡, 有 *Col X* 的表达, Vimentin 检测发现, 在此区和周围正常软骨间有正常肥大区软骨细胞异常分化而来的成纤维样细胞并形成软骨外膜样结构, 次损伤区和软骨外膜结构逐渐被骨桥替代, 在此过程中软骨外膜样结构存在 *Col1a1*、*Ptch1* 和 *Ihh* 的表达, 提示 *Ihh* 可能参与骨桥形成过程. 提出骨桥形成过程中损伤中心区域存在膜内化骨, 边缘区域存在软骨化骨作用机制.

**关键词** 骨骺, 软骨细胞, 膜内化骨, 软骨化骨

**学科分类号** Q503, R681.4

对于骨骺损伤后骨桥形成机制的研究目前十分少见, 大多数研究围绕在骨桥形成的预防以及形成后的治疗和临床效果评价上. 对于形成骨桥的原因, 早期的研究认为骨桥的发生与位于生长板静止区的干细胞受损有关<sup>[1]</sup>, 或者是认为它与干骺端基底膜损伤有关<sup>[2]</sup>, 也有研究认为与骺端、生长板交接处受损有关<sup>[3,4]</sup>. 近期的研究<sup>[5]</sup>认为骨骺损伤后骨桥的形成是一种膜内化骨的过程<sup>[6]</sup>.

对于骨骺损伤诱发的骨桥发生过程中细胞水平及分子水平机制方面的研究, 无疑会为更好地采用生物学治疗方法预防骨桥的发生及诱导适合的软骨重建, 提供很多有价值的证据. 本实验利用胫骨近端干骺端骨骺损伤的大鼠动物模型, 研究骨桥形成分子病理机制.

## 1 研究方法

### 1.1 胫骨近端干骺端骨骺损伤的大鼠动物模型的建立

6 周 S-D 雄性大鼠, 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉. 手术操作: 取 5 mm 皮肤竖直切口, 暴露胫骨

近端前内侧, 用高速牙科磨钻, 2 mm 直径钻头, 在近生长板 5 mm 处骨干中间处开窗, 再将钻头通过此窗插入干骺端生长板中间造成骨骺损伤<sup>[6]</sup>.

### 1.2 取材及标本处理

实验动物: 24 只大鼠单侧胫骨近端骨骺损伤, 右侧损伤侧按照模型损伤, 左侧未损伤作为正常对照.

取材时间点: 术后 1, 3, 7, 10, 14, 28 天, 每个时间点  $n = 4$ .

标本处理: 保留整个胫骨, 所有取材标本经过 4% 多聚甲醛过夜固定, 0.5 mol/L EDTA 脱钙后进行石蜡包埋, 5  $\mu$ m 厚切片.

### 1.3 病理组织学、免疫组织化学和原位杂交检测

**1.3.1 Alcian blue 染色.** 形态学观察损伤愈合过程、骨桥形成.

**1.3.2 原位细胞凋亡检测.** 采用 Tunel 试剂盒检测

\* 通讯联系人.

Tel: 029-84775290, E-mail: orth1@fmmu.edu.cn, jiqiang@fmmu.edu.cn

收稿日期: 2008-01-15, 接受日期: 2008-04-14

损伤区及周围细胞凋亡情况。

**1.3.3 免疫组织化学检测.** Col X: 检测周围残留软骨是否正常表达基质蛋白; Vimentin: 肥大区软骨细胞的标记蛋白, 观察损伤区周围肥大区软骨细胞是否改变。

**1.3.4 原位杂交**(本实验所有探针均采用  $^{35}\text{S}$  标记的 RNA 探针). *Col2a1*: 软骨细胞标记, 检测损伤区是否有软骨细胞生成, 确定损伤周边软骨细胞是否存活; *Col1a1*: 成骨细胞标记, 检测损伤区是否有成骨细胞生成; *Ihh*: 检测 *Ihh* 表达范围; *Ptc1*: 检测 *Ptc1* 表达阳性细胞, 损伤区是否有其表达, 及周围未损伤软骨是否正常表达。

## 2 结 果

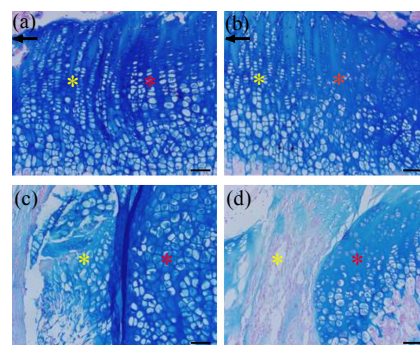
### 2.1 大鼠胫骨组织病理学变化

组织学观察: Alcian blue 染色发现, 第 1 天创伤形成, 炎症发生并伴有大量炎症细胞, 第 3 天血肿形成, 第 7 天血肿机化, 富含成纤维细胞样细胞, 第 10 天血肿机化继续, 2 周时骨桥出现, 开始有少量骨桥小梁形成, 4 周时骨桥重建, 成熟骨小梁并伴有丰富骨髓。

高倍镜下观察发现, 在损伤区与正常软骨细胞间有一次损伤区域, 次损伤区和正常软骨细胞间有一细胞带, 有软骨细胞的基本形态但是出现一些异常, 如形态变大, 胞核偏移。在损伤毗邻区软骨中, 细胞核已经由于机械力量而离开原有的位置, 而离损伤区较远的部位, 位于软骨陷窝中的软骨细胞看起来很正常。损伤后第 7 天, 在正常软骨毗邻次损伤区的位置形成一个明显的膜结构。到骨桥形成时, 膜型结构已经不明显, 代替它的是骨组织的形成(图 1)。

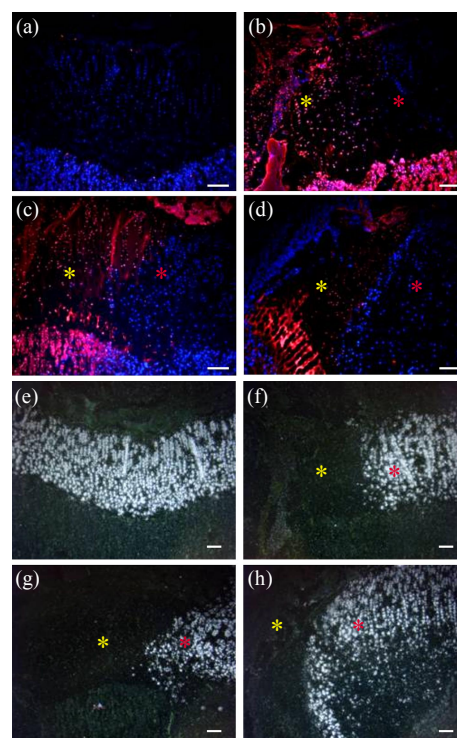
### 2.2 细胞凋亡检测

在生长板损伤初期, 可以看到损伤局部有很多细胞死亡, 而在与创伤毗邻区域的大量软骨细胞也发生明显的细胞凋亡(创伤区完全红色; 次损伤区有一点蓝色背景, 所以看起来有些像紫色的信号; 正常软骨区完全蓝色)。第 3 天发现, 虽然次损伤区软骨基质结构完好, 没有明显损伤及降解, 但是此区中细胞凋亡仍然明显。随着时间的推移, 次损伤区由于不具备自我更新的能力, 从而在后面的阶段逐渐被周围破骨细胞降解。随着时间推移, 凋亡细胞逐渐减少。当骨桥形成及骨重建发生后, 明显的细胞凋亡很难被检测到(图 2)。



**Fig. 1 Cellular characteristic of chondrocyte within the sub-injury cartilage**

(a)~(d) Alcian blue staining. (a) On day 1 after injury, the chondrocytes within the sub-injury cartilage ( \* ) were undistinguishable with the farside, normal chondrocytes ( \* ). (b) On day 3, the chondrocytes within the sub-injury cartilage ( \* ) were found dislocated with their cartilage lacunas. (c) On day 7, the disorganized sub-injury cartilage ( \* ) began to degrade and gradually replaced by the future bone-forming cells on day 10 (d). Bar in (a) (also applies to b~d) = 100  $\mu\text{m}$ . Black arrow indicates the injury direction.



**Fig. 2 Chondrocytes in the sub-injury cartilage underwent apoptosis and not express chondrocyte marker *Col2a1***  
(a~d, TUNEL assay; e~f, *In situ* hybridization using *Col2a1* riboprobe)

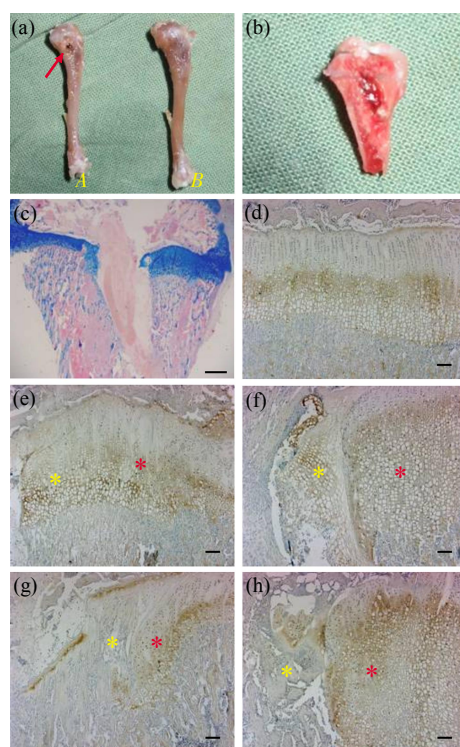
(a) In the un-injured growth plate cartilage, there were only a few cells in the chondro-osseous junction showing positive TUNEL signals. (b) The chondrocytes within the sub-injury cartilage ( \* ) showed positive TUNEL signals immediately on day 1 and distinct with farside, normal chondrocytes ( \* ). On the following stages, day 3 (c) and day 7 (d), there still had many sub-injured chondrocytes undergoing apoptosis. Un-injured chondrocytes expressed *Col2a1* as the specific molecular marker (e). (f~h) Compared to the farside, normal chondrocytes ( \* ), the chondrocytes within the sub-injury cartilage ( \* ) didn't express *Col2a1* on day 1 (f), day 3 (g), day 7 (h) and that indicated they were not functional active. Bar=100  $\mu\text{m}$ .

## 2.3 免疫组织化学检测

### 2.3.1 ColX (X型胶原).

正常肥大软骨细胞区细胞外基质呈现阳性染色反应, 在损伤愈合过程中, 与 Alcian blue 染色及 TUNEL 染色相一致, 均可以见到次损伤区软骨逐渐降解, 但是 X 型胶原的染色在次损伤区中的表达并没有改变, 仍然呈阳性反应, 只是随着时间进展和骨桥形成, 这种坏死组织开始降解而减弱至完全消失。

作为肥大区软骨细胞的标志蛋白, 在损伤区与正常软骨细胞间检测到, 说明该区域软骨外基质完好。证实在次损伤区虽然有大量的软骨细胞凋亡, 但并不是由软骨基质破坏引起的, 猜想可能是该区域的软骨细胞在创伤发生时力学损伤的结果(图 3)。



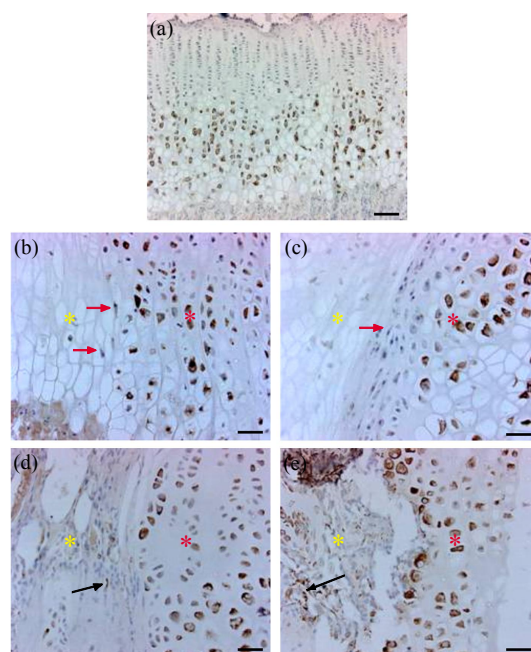
**Fig. 3 The injured transphyseal cartilage and the changes of adjacent physeal cartilage**

Rat injured growth plate cartilage model was generated on proximal tibia by a 2-mm dental bur inserted from metaphyseal bone beneath (a: A, injured tibia, → showing the insertion site; B, un-injured tibia). The growth plate was interrupted centrally (b and c, section plan and Alcian blue staining). Compared to the un-injured growth plate cartilage (d), both the adjacent cartilage (★) and the farside cartilage (★) showed similar matrix structure indicated by the Collagen-X immunostaining on day 3 after injury (e). The adjacent cartilage (★) began to degrade on day 7(f) and was infiltrated by the bone-forming cells on day 10 (g) and replaced by the bone bridge gradually on day 14 (h). Bar in (c) = 500 μm, bar in (d~h) = 100 μm.

### 2.3.2 Vimentin.

未分化间充质细胞和肥大软骨细胞的标记, Vimentin 是细胞骨架成分, 位于肥大软骨细胞的细胞质中, 可以让我们清楚地将肥大软骨细胞与增殖区软骨细胞区分开。另外, 在生长板损伤愈合过程中, 从骨髓侵入的未分化间充质细胞也表达 Vimentin 蛋白, 但细胞形状较小, 位于损伤部位, 所以比较容易与肥大区软骨细胞相区分。

损伤后第 3 天, 在正常软骨组织与次损伤组织之间有成纤维细胞样细胞形成, 鉴于其周围组织完整, 所以它们可能是由软骨细胞异常分化而来。随着越来越多的软骨细胞异常分化成这种成纤维样细胞, 到损伤后第 7 天, 在正常软骨毗邻次损伤区的位置已经形成明显的膜结构, 包括很多成纤维样细胞。到骨桥形成时, 膜型结构已经不明显, 代替它的是骨组织的形成。周围组织的完好排除了这种成纤维状细胞是从骨髓而来。有理由相信, 这些成纤维状细胞可能是成骨细胞或其前体细胞(图 4)。



**Fig. 4 Transient presence of the fibroblast-like cells**

(a) In the un-injured growth plate cartilage, vimentin was expressed specifically by the hypertrophic chondrocytes. During the bony repair process, the infiltrated mesenchymal cells were also vimentin positive [(d) and (e), indicated by black arrow→]. (b) On day 3, the sub-injured chondrocytes (★) didn't express vimentin any more. Interestingly, a few fibroblast-like cells (indicated by red arrow→) came forth between the sub-injured cartilage (★) and the normal cartilage (★). (c) On day 7, more fibroblast-like cells presented to this region and formed a perichondrium-like structure. However, this perichondrium-like structure seemed to disappear gradually from day 10 (d), and replaced by bone bridge on day 14 (e). Bar=100 μm.

## 2.4 原位杂交

### 2.4.1 *Col2a1* (Ⅱ型胶原).

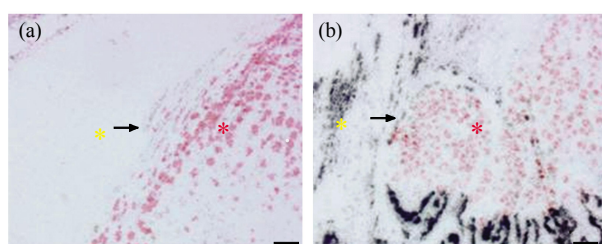
作为软骨细胞的标志蛋白, 采用原位杂交技术检测次软骨损伤区 *Col2a1* (Ⅱ型胶原的基因名称) 的表达. 采用  $^{35}\text{S}$  (同位素) 标记 RNA 探针, 来检测石蜡切片中 Ⅱ型胶原的表达, 信号为白色的.

在未损伤生长板中, 整个软骨板, 包括各层软骨细胞均表达 *Col2a1*. 当损伤发生后, 与细胞凋亡结果相对照, 可以发现, 每张图的左侧发生细胞凋亡的软骨细胞和完全损伤区软骨细胞均没有 *Col2a1* 的表达, 而远离损伤局部的正常软骨细胞可以表达正常的 *Col2a1* (图 2e~h).

### 2.4.2 *Col1a1* (Ⅰ型胶原).

作为成骨细胞的标志蛋白, 采用原位杂交技术检测次软骨损伤区 *Col1a1* (Ⅰ型胶原的基因名称) 的表达. 采用  $^{35}\text{S}$  (同位素) 标记 RNA 探针, 来检测石蜡切片中 Ⅰ型胶原的表达, 信号为黑色的.

生长板损伤后, *Col1a1* 的表达在软骨-骨交接处有缺失. 损伤后第 7 天, 在软骨外膜样结构区域有 *Col1a1* 的低表达, 损伤后第 14 天, 位于该区域的 *Col1a1* 的低表达逐渐趋强, 这表明, 有成骨细胞的逐渐出现, 并且随着时间的推移, *Col1a1* 的表达不仅局限于软骨外膜样组织 (图 5).

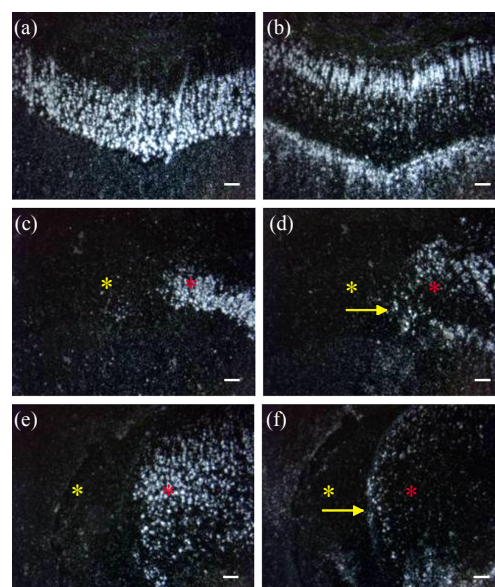


**Fig. 5 The perichondrium-like tissue expressed *Col1a1*, a specific osteoblast marker**

The low level expression of *Col1a1* (indicated by black arrow →) in perichondrium-like tissue between the degraded sub-injured cartilage ( \* ) and the normal cartilage which expressing *Col2a1* ( \* ) was detectable from day 7 (a) and became more obvious on day 10 (b). Bar = 100 μm.

**2.4.3 *Ihh* 和 *Ptch1*.** 在正常生长板中, *Ihh* 由肥大前区及肥大区软骨细胞分泌, 而 *Ptch1* 则在增殖区软骨细胞及软骨-骨交接处表达, 这些细胞接受 *Ihh* 信号. 生长板刚损伤时, *Ptch1* 的表达除了在软骨-骨交接处缺失外, 增殖区软骨细胞并没有明显改变, 损伤后第 3 天, 在肥大区软骨细胞及成纤维

样细胞有 *Ptch1* 的表达, 这表明 *Ihh* 信号可以作用到毗邻次损伤区的这些细胞, 并且激活受体细胞中的通路, 随着时间的推移, *Ptch1* 的表达局限于软骨外膜样组织 (图 6).



**Fig. 6 *IHH* signaling was involved in the formation of the perichondrium-like tissue**

(a), (c), (e), detecting *Ihh* by *in situ* hybridization; (b), (d), (f), detecting *Ptch1* by *in situ* hybridization). *In situ* hybridizations using *Ihh* and *Ptch1* probes were carried out on adjacent sections to facilitate the comparison of their expression patterns. (a), (b) In un-injured growth plate cartilage, *Ihh* was expressed in the prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes and *Ptch1* was expressed in the proliferating chondrocytes and chondro-osseous junction cells. (c), (d) On day 3, *Ihh* was expressed in the remaining normal chondrocytes ( \* ) and the dead, sub-injured chondrocytes ( \* ) didn't express *Ihh* any more (c). *Ptch1*, except for the proliferating chondrocytes and chondro-osseous junction cells, was also expressed between the sub-injured cartilage and the normal cartilage, where was supposed to form the perichondrium-like tissue later (d, indicated by the yellow arrow →). (e), (f) On day 7, the *Ptch1* expression between the sub-injured cartilage ( \* ) and normal cartilage ( \* ) was localized the perichondrium-like region (f, indicated by the yellow arrow →). Bar=100 μm.

## 3 讨 论

骨折愈合十分复杂, 卷入两种机制: 膜内化骨及软骨内化骨. 虽然生长板损伤诱发的骨生长阻滞是临床骨科所面临的一个难点, 有些实验研究试图在动物模型上探索生长板损伤的治疗方法<sup>[6~8]</sup>, 但是对于损伤诱导的骨桥发生过程中细胞水平及分子水平机制方面的研究却很少.

有研究通过证明骨桥形成过程中没有软骨细胞出现, 以及侵入损伤区的未分化间充质细胞直接转变成 *Cbfa1* 阳性的成骨细胞, 来验证骨桥形成是通过膜内化骨的过程<sup>[9~11]</sup>. 软骨内化骨及膜内化骨中最大的区别虽然是有无软骨细胞的形成, 但是目前新的研究表明, 软骨内化骨的本质是软骨外膜组织中未分化间充质细胞直接转化成成骨细胞, 但此分化过程却需要软骨细胞分泌的各种生长因子的参与, 如 *Ihh*<sup>[11~18]</sup>. 所以虽然有研究证明在骨桥形成过程中没有新的软骨细胞产生, 但不代表骨桥形成不受周围软骨细胞分泌的因子影响.

骨骺区域在损伤发生前已有大量成熟的软骨细胞存在, 存在许多与成骨过程有关的因子, 损伤后在邻近区域存在一定数量结构与功能完好的软骨细胞, 因而骨骺损伤的过程可被看作是一种软骨细胞的死亡或凋亡过程, 类似于软骨化骨过程中软骨形成后过渡过程中的软骨细胞消失. 在这一过程中, 软骨细胞损伤后细胞内一些与成骨有关成分释放出来, 可以诱导刺激后续成骨过程.

假设骨骺损伤后, 未分化间质细胞、成骨细胞前体细胞、血细胞等伴随骨髓进入损伤区域, 在原有的各种与成骨有关的因子以及碎裂的软骨细胞释放出或是从邻近软骨细胞生成后转移来的与成骨相关的各种因子作用下, 出现成骨细胞等一系列变化, 这种成骨过程并不能把它归为单纯的膜内化骨过程, 可以认为是两种成骨机制共同参与作用的结果.

我们的研究建立在这种假设基础上, 探讨在骨骺损伤后骨桥形成过程中, 邻近的正常软骨细胞在损伤后是否发生一些变化参与骨桥形成过程, 是否存在各种与成骨有关的因子生成后转移到该区域中共同作用, 进而影响探讨骨桥形成的机制. 我们通过免疫组织化学技术及原位杂交技术, 检测骨骺损伤区域中是否存在由碎裂的软骨细胞释放出或是从邻近软骨细胞生成后转移到该区域中的与成骨相关的各种因子, 如 *Ihh* 信号通路.

*Ihh* 由肥大前区及肥大区软骨细胞分泌, 调节软骨细胞增殖、分化, 还刺激生长板外膜未分化间充质细胞向成骨细胞分化. 在软骨细胞及成骨细胞中特异性地敲除 *Ihh* 功能的实验证实 *Ihh* 的确参与软骨内化骨过程中软骨形成及骨形成过程. *Ihh* 基因剔除的小鼠模型四肢虽然有异常的软骨形成, 却没有骨化过程, 而小鼠体内膜内化骨过程却不受影响, 说明长骨骨组织形成过程依赖于软骨细胞分泌

*Ihh* 的作用<sup>[14~18]</sup>.

*Ptch1* 是 *Ihh* 信号通路受体细胞上的受体蛋白及下游目标基因, 在接受 *Ihh* 信号的细胞中, *Ptch1* 表达上调. 由于 *Ihh* 不参与膜内化骨过程, 所以在膜内化骨过程中未分化间充质细胞/成骨细胞前体细胞不表达 *Ptch1* 基因, 而在软骨化骨过程中, 则刚好相反, 成骨细胞前体细胞中 *Ptch1* 基因表达明显, 所以这是区分膜内化骨及软骨内化骨过程的标志之一<sup>[14~18]</sup>.

我们发现骨骺完全损伤区的软骨细胞未见生成 *Col2a1*、*Col X* 及 *Ihh*、*Ptch1* 等特异性因子并且不能表达其标记蛋白. 在生长板损伤过程及其修复过程中伴有次损伤软骨带的形成及降解, 随之骨桥最后形成. 次损伤软骨带的软骨细胞不能表达其标记蛋白 *Col2a1*, 所以看起来次损伤带中的凋亡细胞也不能再分泌其他因子参与骨桥形成. 但是在组织学检测及 *Vimentin* 组织化学染色中却发现了介于正常软骨组织及次损伤软骨带之间有膜样结构形成, 类似于软骨外膜, 并随着时间推移逐渐发生骨化. 还发现少量肥大区软骨细胞发生异常增殖并且可能异常分化到成纤维细胞样细胞, 最终在正常软骨细胞边缘形成一层类似于软骨外膜的组织. *Col1a1* 在损伤早期出现膜样结构时在此区域有表达, 进而表达增强至出现大量成骨细胞. 干骺部生长板损伤后骨桥形成过程中是否有 *Ihh* 信号参与是证明此过程是否有软骨内化骨机制参与的最有力证据. 骨桥形成区域的确有 *Ptch1* 的表达, 这说明由损伤区邻近肥大前区、肥大区软骨细胞分泌的 *Ihh* 可以扩散至损伤区域, 诱导受体细胞表达 *Ptch1*, 促进骨桥形成.

根据本实验结果, 我们提出骨桥形成过程是两种骨形成机制共同参与作用的结果, 除了完全损伤区中形成的骨桥是通过骨髓源性的骨前体细胞聚集发生的膜内化骨过程外, 次损伤软骨带的骨桥形成是通过软骨源性介导的软骨内化骨过程. 但是损伤区和次损伤软骨带之间的关系还需要进一步的研究.

## 参 考 文 献

- 1 Ianotti J P. Growth plate physiology and pathology. *Orthop Clin N Am*, 1990, **21**(1): 1~17
- 2 Joyce M E, Jingushi S, Scully S P, et al. Role of growth factors in fracture healing. *Prog Clin Biol Res*, 1991, **365**(3): 391~416
- 3 Kronenberg H M. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 2003, **423**(6937): 332~336

- 4 St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon A P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev*, 1999, **13** (16): 2072~2086
- 5 Canalis E, Economides A N, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev*, 2003, **24** (2):218~235
- 6 Lee M A, Nissen T P, Otsuka N Y. Utilization of a murine model to investigate the molecular process of transphyseal bone formation. *J Pediatr Orthop*, 2000, **20**(6): 802~806
- 7 Wattenbarger J M, Gruber H E, Phieffer L S. Physeal fractures, part I : histologic features of bone, cartilage, and bar formation in a small animal model. *J Pediatr Orthop*, 2002, **22**(6): 703~709
- 8 Garimella R, Bi X, Camacho N, *et al.* Primary culture of rat growth plate chondrocytes: an *in vitro* model of growth plate histotype, matrix vesicle biogenesis and mineralization. *Bone*, 2004, **34** (6): 961~970
- 9 Chung R, Cool J C, Scherer M A, *et al.* Roles of neutrophil-mediated inflammatory response in the bony repair of injured growth plate cartilage in young rats. *J Leukoc Biol*, 2006, **80**(6): 1272~1280
- 10 Xian C J, Zhou F H, McCarty R C, *et al.* Intramembranous ossification mechanism for bone bridge formation at the growth plate cartilage injury site. *J Orthop Res*, 2004, **22**(2): 417~426
- 11 Zhou F H, Foster B K, Sander G, *et al.* Expression of proinflammatory cytokines and growth factors at the injured growth plate cartilage in young rats. *Bone*, 2004, **35**(6): 1307~1315
- 12 Glodring M B, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem*, 2006, **97**(1): 33~44
- 13 Aracsapam G, Scherer M, Coll J C, *et al.* Roles of COX-2 and iNOS in the bony repair of the injured growth plate cartilage. *J Cell Biochem*, 2006, **99**(2): 450~461
- 14 Long F, Chung U I, Ohba S, *et al.* Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development*, 2004, **131**(6): 1309~1318
- 15 Maeda Y, Nakamura E, Nguyen M T, *et al.* Indian Hedgehog produced by postnatal chondrocytes is essential for maintaining a growth plate and trabecular bone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(15): 6382~6387
- 16 Young B, Minugh-Purvis N, Shimo T, *et al.* Indian and sonic hedgehogs regulate synchondrosis growth plate and cranial base development and function. *Dev Biol*, 2006, **299**(1): 272~282
- 17 Long F, Joeng K S, Xuan S, *et al.* Independent regulation of skeletal growth by Ihh and IGF signaling. *Dev Biol*, 2006, **298**(1): 327~333
- 18 Kobayashi T, Soegiarto D W, Yang Y, *et al.* Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP. *J Clin Invest*, 2005, **115**(7): 1734~1742

## Ossification Mechanism for Bone Bridge Formation After Physical Injury in Young Rats

JIE Qiang<sup>1)</sup>, HU Yun-Yu<sup>1)\*</sup>, YANG Liu<sup>1)</sup>, LEI Wei<sup>1)</sup>, ZHU Qing-Sheng<sup>1)</sup>,  
LI Ming-Quan<sup>1)</sup>, ZHAO Li<sup>2)</sup>, LÜ Rong<sup>1)</sup>, WANG Jun<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Xijing Hospital, Xi'an 710032, China;

<sup>2)</sup>Department of Pediatric Orthopaedics and Rehabilitation, Xin-Hua Hospital, Shanghai 200092, China)

**Abstract** Children Salter's type III and IV growth plate injuries always induce the skeletal deformity because of bony bridge formation. However, the underlying cellular and molecular changes of the remaining cartilage adjacent to the injury site are still unclear. The purpose of this investigation was to understand the molecular mechanisms of bony bridge formation. The *in vivo* cellular and molecular changes in the adjacent cartilage were studied in the rat growth plate injury models. Consisted with the histological changes, both Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling (TUNEL) assay and *in situ* hybridization experiment using *Col2a1* probe showed there was the sub-injury cartilage region adjacent to the original injury site. Despite the sub-injury region remained normal cartilage structure and Collagen type X in the extracellular matrix, the chondrocytes within this region showed the dislocation with the cartilage lacunas, and the strand breaks of cleaved DNA in TUNEL assay. That these chondrocytes didn't express *Col2a1* mRNA further confirmed they were dead cells. Along with the degradation of sub-injury cartilage, some fibroblast-like cells presented to the cartilaginous region between the sub-injury region and uninjured cartilage. *In situ* hybridization experiment for *Patched 1* (*Ptch1*), indicator of Indian Hedgehog (IHH) signaling, indicated these fibroblast-like cells could respond to Hh signaling. These results suggest that the bony bridge formation involves series of changes of chondrocytes and *Ihh* signaling may be

involved in the formation of the transient perichondrium-like structure between the sub-injury cartilage and normal cartilage, and partially contribute to the bony bridge formation. Investigating the underlying cellular and molecular changes after the transphyseal injury will contribute us to explore a prevention treatment in the future clinic.

**Key words** physis, chondrocyte, intramembranous ossification, endochondral ossification

---

\*Corresponding author .

Tel: 86-29-84775290, E-mail: orth1@fmmu.edu.cn, jiqiang@fmmu.edu.cn

Received: January 15, 2008 Accepted: April 14, 2008