

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.08.001

FGFR2 功能增强对软骨内成骨作用的机制研究^{*}

陈 鹏¹,张凡喜¹,周玉峰¹,张 波^{2△}

(1.解放军第 324 医院神经外科,重庆 400020;2.第三军医大学大坪医院野战外科研究所,重庆 400042)

[摘要] **目的** 利用模拟人 Apert 综合征的 FGFR2^{S252W/+} 小鼠模型,研究 ERK 信号通路在成纤维细胞生长因子受体 2(FGFR2)功能持续增强对软骨内成骨过程的影响。**方法** 动物繁殖、鉴定后分为 FGFR2 功能获得突变型和同窝野生型。于出生后 6 周获取骨髓间充质干细胞(BMSCs)进行体外培养及 2 代 BMSCs 成软骨诱导,对 ERK 信号蛋白检测,并比较 Col2、Col10、OC、OP 基因的表达。加入 ERK 信号通路阻滞剂 PD98059 后再次培养观察相应基因的表达。胚胎骨体外培养技术比较 ERK 信号通路在 FGFR2 功能持续增强对软骨内成骨过程的影响。**结果** 在体外 BMSCs 成软骨诱导后观察发现,FGFR2 功能突变小鼠 BMSCs 表达总 ERK 蛋白量无明显变化,但磷酸化增强。FGFR2^{S252W/+} 小鼠 BMSCs 表达 Col2、Col10 较野生型弱,但 OC、OP 基因强于野生型小鼠。加入 ERK 信号通路阻滞剂 PD98059 培养后,对 Col2、Col10 基因影响不大,但 OC、OP 表达量增高。并且在胚胎骨体外培养过程中,发现 PD98059 治疗组能纠正 FGFR2 功能持续增强所致软骨内成骨发育障碍。**结论** ERK 信号通路是 FGFR2 下游影响软骨内成骨的关键通路,特别对软骨内成骨后期成骨过程影响巨大。其信号通路阻滞剂对软骨内成骨发育障碍有一定救治作用。

[关键词] 成纤维细胞生长因子受体 2;ERK 信号通路;骨髓间充质干细胞;软骨内成骨;软骨分化
[中图分类号] R336 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)08-1009-03

The study of the mechanism in the endochondral ossification of bone mesenchymal stem cells in mice by continued enhanced function of fibroblast growth factor type II receptor mutation^{*}

Chen Peng¹,Zhang Fanxi¹,Zhou Yufeng¹,Zhang Bo^{2△}

(1. Department of Neurosurgery, PLA Hospital 324, Chongqing 400020, China; 2. Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective** To study the role of ERK signal pathway in the endochondral ossification of bone mesenchymal stem cells, and to explore the mechanism of ERK signal pathway in persistent enhanced FGFR2 function on development of mice BMSCs by a knock-in mouse model with the FGFR2^{S252W/+}. **Methods** Mice with neo-FGFR2 gain-of-function mutation were mated with EII-Cre mice. The genotype of generation mice were identified by PCR and divided into wild type group and mutant type group according to their genotype. 6 week-old mice were sacrificed to receive bone mesenchymal stem cells. The western blot was used to compare the level of P-ERK and ERK and the RT-PCR was applied to detect the genes of Col2, Col10, OC, OP in chondrogenic differentiation medium of BMSCs. Then, treatment of cultured BMSCs with PD98059, compare the changes of genes and utilize the in vitro culture of long bones detect the role of ERK signal pathway in the endochondral ossification by FGFR2 mutant. **Results** We successfully derive BMSCs from FGFR2^{S252W/+} mutant mice and found the activity of ERK signal pathway of FGFR2^{S252W/+} was enhanced. After been cultured in chondrogenic differentiation medium, the expressions of the BMSCs mRNA of Col2, Col10 from mutant group were decreased, while the expressions of OC, OP were increased. Those OC, OP genes levels showed an increased treated by PD98059. Using in vitro culture of long bones, we found the retardation of total length growth of long bones has been rescued by PD98059 treatment, suggesting that ERK signal pathways was responsible for the retarded long bone development in FGFR2^{S252W/+} mice. **Conclusion** The results indicate these effects are mediated by the ERK signal pathway. Furthermore, the retardation of long bones has been recued by PD98059 treatment, suggesting that ERK signal pathway is responsible for the retarded long bone development in FGFR2^{S252W/+} mice.

[Key words] FGFR2; ERK signal pathway; bone mesenchymal stem cells; endochondral ossification; chondrogenic differentiation

利用基因敲入(knock in)技术构建模拟人 Apert 综合征的 FGFR2^{S252W/+} 小鼠模型,Apert 综合征由成纤维细胞生长因子受体 2(fibroblast growth factor receptor2, FGFR2)的功能增强型点突变引起,患者表现冠状缝早闭、体形弱小、四肢短小畸形和指/趾畸形^[1]。FGFR2 功能增强对膜内成骨及软骨内成骨过程均有影响^[2-4],在对软骨内成骨过程中,FGFR2 可能是通过下游 MAPK 通路进行调控,本研究主要探讨 ERK 信号通路

在 FGFR2 功能持续增强对软骨内成骨过程的影响。

1 材料与方法

1.1 动物来源 本实验模型小鼠由美国国立卫生研究院(NIH)引入^[5],分别将雄性带 neo 基因+突变 FGFR2 的工程小鼠、雄性 EII-Cre 小鼠与雌性 C57BL/6J 小鼠(2~4 月龄)交配扩增,得到的 F1 代经鉴定带 neo 基因+突变 FGFR2 的基因小鼠和 EII-Cre 小鼠再次交配,EII-Cre 启动子去掉 FG-

^{*} 基金项目:国家 973 计划重点基础研究发展计划基金资助项目(2011CB964701)。 作者简介:陈鹏(1983—),医师,硕士,主要从事临床神经外科研究。 △ 通讯作者, Tel:13527371337; E-mail:zhangbo67184@163.com。

FR2-neo-S252W 的 neo 基因,在子代中获得约 1/4 数量的 FGFR2^{S252W/+} 功能获得性突变小鼠。小鼠基因型鉴定分为野生和突变(FGFR2^{S252W/+})两组。EII-Cre、C57BL/6J 小鼠由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。所有小鼠均为 SPF 级,在实验过程中由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心饲养。

1.2 主要试剂与仪器 台式高速冷冻离心机(Sigma 公司,德国),电泳仪(Bio-Rad 公司,美国),PCR System 7500(Applied Biosy Stems 公司,美国),PCR 仪(香港 Gene Amp 公司),凝胶成像系统(Bio-Rad 公司,美国),超净工作台(成都新光生物净化工程研究所),细胞培养箱(Thermo Forma 公司,美国),显微镜(Olympus 公司,日本),Spot 内置彩色数码相机(Diagnostic Instruments 公司,美国)。主要试剂:蛋白酶 K(Roche 公司,美国),地塞米松、TGF- β (Peprotech 公司,美国),ITS(Sigma 公司,美国),Rever Tre Ace-a 逆转录试剂盒(TOYOBO 公司,日本),Trizol(Gibco 公司,美国),Phospho-ERK/ERK 抗体(Cell signal technology 公司,美国),ERK 阻滞剂 PD98059(Selleck 公司,美国),高糖 DMEM、低糖 DMEM、胎牛血清、胰蛋白酶(Hyclone 公司,美国),PBS 液。

1.3 FGFR2^{S252W/+} 小鼠基因型的鉴定^[6] 小鼠剪取手指/脚趾,用含 100 mg/L 蛋白酶 K 的组织裂解液 56 °C 裂解 12 h,提取基因组 DNA。用以下引物进行扩增:带 neo 基因+突变 FGFR2 小鼠,R₂-7R₂:5'-TTG ATC CAC TGG ATG TGG GGC-3',RINA:5'-CCA GAC TGC CTT GGG AAA AGC-3';EII-Cre 小鼠,C₁:5'-GCC TGC ATT ACC GGT CGA TGC-3',C₂:5'-CAG GGT GTT ATA AGC AAT CCC-3';FGFR2^{S252W/+} 小鼠,R₂I6F₁:5'-TAG GTA GTC CAT AAC TCG G-3',R₂-7R₂:5'-TTG ATC CAC TGG ATG TGG GGC-3'。PCR 产物凝胶电泳后,根据条带对小鼠进行区分(图 1)。

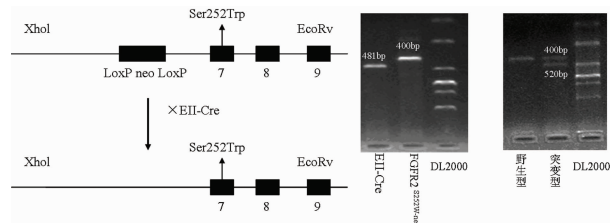


图 1 小鼠基因型鉴定电泳图

1.4 骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)制备 将 6 周龄野生型及突变型小鼠脱臼处死后置于 75% 乙醇浸泡 10 min,无菌条件下分离出胫骨、股骨;用剪刀剪去股骨、胫骨两端,用一次性注射器抽取含有 10% 胎牛血清的 DMEM(低糖)培养液反复冲洗骨髓腔,将骨髓细胞冲入无菌培养皿中;混匀吹散制成细胞悬液后,将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后细胞首次换液,以后每 2 d 换 1 次,7~8 d 后细胞约 90% 融合后,用 0.25% 胰蛋白酶消化 4 min 后吹打,脱落细胞以 1 000 r/min 离心 5 min,按 1:2 比例传代培养。选取生长良好的第 2 代细胞进行实验。

1.5 BMSCs 成软骨诱导分化及信号阻断剂培养 取生长状态良好的第 2 代 BMSCs,以 5×10^5 /孔接种于 6 孔板中,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 低糖培养基培养细胞。生长 7 d 左右,待细胞生长完全融合,换用成软骨诱导培养液[含有 10% 胎牛血清、10 ng/mL 转化生长因子(transforming growth factor,TGF- β)、50 μ g/mL 抗坏血酸、 10^{-7} mol/L 地塞米松、50 mg/mL 胰岛素铁硒传递蛋白(insulin-transferrin-selenium,

ITS)]的 DMEM 高糖培养基进行成骨诱导,每 3 d 换液 1 次。为了解 ERK 信号通路在软骨内成骨过程中的作用,在软骨诱导液基础上加入 ERK 信号通路阻滞剂 PD98059,浓度 20 μ mol,进行培养。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测基因表达 取成软骨诱导培养 14 d 细胞,加入 1 mL Trizol 提取 RNA。紫外分光光度计测定纯度及浓度。取总 RNA 1 μ g,采用逆转录试剂盒进行逆转录反应,逆转录的 cDNA 置 -20 °C 保存。小鼠的引物序列如下,Col2,sense primer,5'-TCT TTG GCT CAC TGG ACT CT-3',antisense primer,5'-CCC CTC CTG CTG TGA AGT TG-3';Col10,sense primer,5'-GCA GCA TTA CGA CCC AAG AT-3',antisense primer,5'-CAT GAT TGC ACT CCC TGA AG-3';OC,sense primer,5'-TCT GAC AAA GCC TTC ATG TCC-3',antisense primer,5'-AAA TAG TGA TAC CGT AGA TGC G-3';OP,sense primer,5'-TGC ACC CAG ATC CTA TAG CC-3',antisense primer,5'-TGT GGT CAT GGC TTT CAT TG-3'。以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,每次做 3 个复孔,每个基因重复 3 次。扩增条件:94 °C 5 min;94 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 30 s,45 个循环。加完样后上实时荧光定量 PCR 仪反应。

1.7 Western blot 检测 取 2 代 BMSCs,提取总蛋白,制备 5% 浓缩胶和 10% 分离胶。每个孔上样 10 μ g 蛋白样品,进行电泳。电泳结束后转膜,8% 脱脂奶粉振荡封闭 2 h。按一抗说明书进行稀释、孵育过夜。进行二抗室温孵育,PVDF 条带浸入 ECL 化学发光液发光 5 min 后暗室进行曝光、显影。

1.8 胚胎长骨的体外培养 无菌条件下取胚胎(E16)小鼠胫骨进行消化 10 min(1 mg/mL dispase 溶液),然后在解剖显微镜下进行操作,剥离绝大部分软骨外膜和骨外膜。标本置于滤纸上后放在不锈钢网上面,浸入 BGJb 培养基的井形培养皿的(BGJb 培养基含 0.2% 牛血清清蛋白、50 μ g/mL 维生素 C、10 mM β -甘油磷酸钠、2 mmol 谷氨酸、100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素)。置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度孵箱内孵育。每组各 10 个标本,分为 3 组。即野生型组(加入 0.1% DM-SO)、突变型组(加入 0.1% DMSO)、PD98059 治疗组(突变型组加入 50 μ mol PD98059),每 2 d 换液。体外培养 7 d 后收集标本并固定,在解剖显微镜下测量标本总长度(total length, TL),钙化组织长度(ossified tissue length,OL)。采用长度增加百分率来表示长度的变化。长度增加百分率=(体外培养 7 d 的长度-体外培养 0 d 的长度)÷体外培养 0 d 的长度×100%。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FGFR2^{S252W/+} 小鼠 BMSCs 增强 ERK 信号通路磷酸化程度 对野生及突变 FGFR2^{S252W/+} 小鼠 BMSCs 中 ERK 总蛋白及其磷酸化水平利用 Western blot 技术进行检测。结果显示突变型 FGFR2 功能增强点突变后 BMSCs 中 ERK 总蛋白量表达差异无统计学意义,而磷酸化水平表达增强(图 2)。结果揭示 BMSCs 软骨内成骨过程中 FGFR2 可能经过 ERK 信号通路对其调控。

2.2 PD98059 使 BMSCs 中 ERK 信号通路磷酸化程度减弱 在 BMSCs 成软骨诱导液中加入 ERK 信号通路阻滞剂 PD98059,探索 ERK 信号通路在 FGFR2 介导 BMSCs 软骨内成骨分化的调控作用。再次运用 Western blot 技术发现,

PD98059 抑制 ERK 磷酸化水平,说明抑制 ERK 信号通路,见图 2。

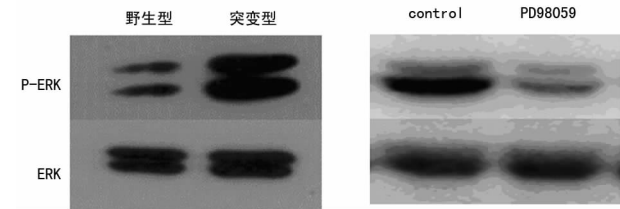
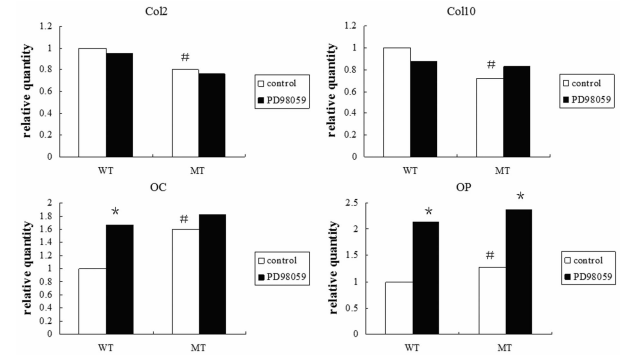


图 2 Western blot 显示 FGFR2^{S252W/+} BMSCs 中信号通路变化

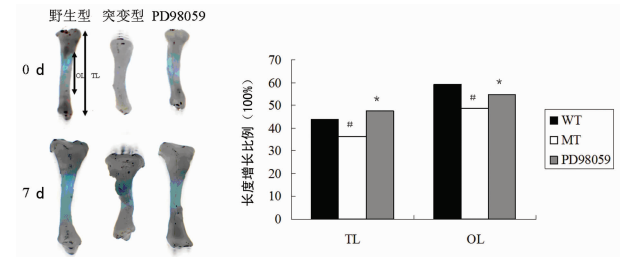
2.3 使用 PD98059 后对 BMSCs 表达基因的影响 利用定量 PCR 方法分别检测 BMSCs 成软骨诱导 21 d 后成软骨、成骨分化基因表达。作者发现表达成软骨分化基因 Col2、Col10 突变型小鼠 BMSCs 表达量低于野生型小鼠 ($P<0.05$),而反应软骨内成骨晚期成骨分化基因 OC、OP 提示突变型小鼠 BMSCs 表达量高于野生型小鼠 ($P<0.05$)。这些结果显示 FGFR2 功能增强对 BMSCs 软骨内成骨分化过程中早期成软骨分化是抑制作用,而晚期成骨分化是促进作用(图 3)。将 BMSCs 在加入 ERK 阻断剂成软骨诱导培养后,检测 21 d 后相关基因的表达变化,发现 PD98059 培养后对 BMSCs 表达 Col2、Col10 变化不大,对表达成骨分化 OC、OP 基因有所增强(图 3)。



*: $P<0.05$,与 control 组 BMSCs 比较; #: $P<0.05$,与 WT 组 BMSCs 比较。

图 3 通路阻滞剂培养对成软骨、成骨基因表达的影响

2.4 体外培养长骨的生长情况 取材胚胎小鼠的胫骨(E16)在体外培养条件下继续生长发育。体外培养 7 d 观察,野生型及突变型小鼠胫骨的 TL 及 OL 有明显差异,突变型小鼠骨发育落后于野生组小鼠,TL、OL 均短于野生型小鼠,说明 FGFR2 增强在体外培养过程中也抑制软骨内成骨过程。而添加 PD98059 后体外培养突变型小鼠长骨 TL 及 OL 明显增长,较突变型小鼠有明显差异,说明 ERK 信号通路阻滞剂 PD98059 可能对由 FGFR2 持续增强介导的软骨内成骨迟缓有救治作用(图 4)。



*: $P<0.05$,与 MT 组比较; #: $P<0.05$,与 WT 组比较。

图 4 胚胎骨体外培养观察及长度增长比例比较

3 讨论

FGFRs 属于受体酪氨酸蛋白激酶(receptor tyrosine kinase,RTK)家族,主要有 4 种受体(FGFR1、2、3、4),他们通过与成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGFs)结合发挥生物学功能。遗传学研究发现部分人类遗传骨骼疾病由 FGFR 突变引起,说明 FGFR 对骨骼的生长发育起着重要作用^[1,6-8]。

利用基因敲入技术建立了 FGFR2 功能获得性基因突变小鼠模型,其 FGFR2 功能持续增强,除了表现颅缝早闭、圆颅畸形外,突变小鼠出现体形弱小、四肢的短缩畸形,这些临床表现符合 Apert 综合征患者临床表现^[9-10]。既往研究发现在骨骼发育过程中,FGFR2 不仅调节成骨细胞的发育,在软骨细胞同样检测到 FGFR2^[2,11],说明 FGFR2 还能够调节软骨细胞发育,影响软骨内过程。

BMSCs 具有取材方便、更新能力强、有多向分化能力等优点受到广泛关注。而在软骨内成骨过程中,正是由骨髓间充质干细胞密集开始,逐渐分化形成软骨细胞及软骨样骨胚,随着破骨细胞侵入、吞噬及其血管延伸形成,软骨细胞被成骨细胞取代,钙化成骨。本实验获得 FGFR2 功能持续增强的骨髓间充质干细胞进行研究,体外模拟软骨内成骨过程,主要研究下游关键信号通路对 FGFR2 介导软骨内成骨的影响。

既往研究证实在骨骼发育过程中 FGFs/FGFRs 信号发挥非常重要的作用,而 MAPK 作为 FGFs/FGFRs 信号下游通路在骨骼发育过程中作用重大,MAPK 通路主要由 ERK、JNK、p38 共 3 种激酶组成,研究表明 ERK 信号通路在成骨细胞和软骨细胞的发育中扮演重要角色^[12-14]。本研究发现 FGFR2^{S252W/+} 突变 BMSCs 的 ERK 磷酸化程度显著增强,这个结果提示 FGFR2 通过调控下游 ERK 通路对软骨内成骨进行调节。为进一步验证结果,继续通过 ERK 信号通路阻断实验证实在体外诱导培养的 BMSCs 中添加 ERK 通路的阻断剂 PD98059,可见显著缓解了 ERK 磷酸化的表达。体外诱导培养 BMSCs 模拟软骨内成骨过程,进一步运用实时荧光定量 PCR 比较通路改变后对成软骨、成骨分化基因的改变。研究发现突变型 BMSCs 联合 ERK 通路阻滞剂联合培养后,成软骨基因 Col2、Col10 变化不大,而成骨相关基因 OC、OP 表达有上调。结合软骨内成骨过程,作者考虑 FGFR2 受体通过下游 ERK 信号通路在早期成软骨过程中 ERK 通路作用影响不大,而在后期成骨过程中通过 ERK 通路负性调节成骨发育过程,最终阻碍软骨成骨过程。既往 Miraoui 等^[12]研究发现在 FGFR2 功能增强的间充质干细胞 C3H10T1/2 中 ERK1/2 及 PKC 通路激活调控成骨增殖、分化过程,对成脂过程影响不大。

作者取胎鼠(E16 d)胫骨构建体外培养模型,进一步验证在软骨内成骨过程中 FGFR2^{S252W/+} 模型中 ERK 通路的影响。体外培养模拟长骨发育过程,实验发现在胚胎发育期间 FGFR2^{S252W/+} 小鼠其长骨总长度及钙化长度均短于野生型小鼠,说明 FGFR2 功能增强导致突变型小鼠软骨内成骨较同窝野生型小鼠迟缓。而经体外运用 ERK 信号通路的阻断剂 PD98059(浓度 50 μmol)联合培养后,突变型小鼠长骨发育障碍得到一定纠正,同之前 Yin 等^[2]报道在 FGFR2^{S253W/+} 模型中体外培养颅骨、长骨中加入 PD98059 延缓颅缝早闭及纠正长骨发育障碍基本一致。本实验证实 FGFR2 增强影响下游 ERK 通路对软骨内成骨过程进行调控,运用 ERK 信号阻滞剂对突变型小鼠软骨内成骨发育迟缓有一定救(下转第 1016 页)

细胞生物学国际会议论文集,2009.

- [2] 林东子,张志珍,梁念慈. H9N2 亚型禽流感病毒 ns1 基因克隆[J]. 广东医学,2006,27(12):1791-1792.
- [3] Baga S,Brancht J,Hunter S,et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation[J]. Cell,2005,122(4):553-563.
- [4] Petersen CP,Bordeleau ME,Pelletier J,et al. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells[J]. Molecular Cell,2006,21(4):533-542.
- [5] Jing Q,Huang S,Guth S,et al. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability[J]. Cell,2005,120(5):623-634.
- [6] Meyerson M,Counter CM,Eaton EN,et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization[J]. Cell,1997,90(4):785-795.
- [7] Xiang H,Wang J,Mao YW,et al. hTERT can function with rabbit telomerase RNA; regulation of gene expression and attenuation of apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun,2000,278(3):503-510.
- [8] 陈始明,陶泽璋,肖伯奎,等. 反义端粒酶催化亚单位抑制喉癌细胞生长的离体实验研究[J]. 临床耳鼻喉科杂志,2003,17(4):226-228.

- [9] Kim JG,Nonneman D,Vallet JL,et al. Linkage mapping of the porcine testis gene transcript (TEGT) gene to chromosome 5[J]. Anim Genet,2003,34(2):152-153.
- [10] Kawai-Yamada M,Saito Y,Jin L,et al. A novel Arabidopsis gene causes Bax-like lethality in Saccharomyces cerevisiae[J]. J Bio Chem,2005,280(47):39468-39473.
- [11] Westphalen BC,Wessig J,Levpoldt F,et al. Bi-1 protects cells from oxygen glucose deprivation by reducing the calcium content of the endoplasmic reticulum[J]. Cell Death Differ,2005,12(3):304-306.
- [12] Ji J,Wernli M,Klimkait T,et al. Enhanced gene silencing by the application of multiple specific small interfering RNAs[J]. FEBS Letters,2003,552(2/3):247-252.
- [13] Li Y,Li M,Yao G,et al. Telomerase inhibition strategies by siRNAs against either hTR or hTERT in oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Gene Ther,2011,18(5):318-325.
- [14] Liang Y,Li XY,Lin RW,et al. Combinatorial gene targeting hTERT and Bi-1 in CNE-2 nasopharyngeal carcinoma cell line[J]. Biomed Rep,2013,1(2):285-293.

(收稿日期:2014-10-10 修回日期:2014-12-18)

(上接第 1011 页)
治作用。

参考文献

- [1] Ornitz DM,Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease[J]. Genes Dev,2002,16(12):1446-1465.
- [2] Yin L,Du X,Li C,et al. A Pro253Arg mutation in fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) causes skeleton malformation mimicking human Apert syndrome by affecting both chondrogenesis and osteogenesis[J]. Bone,2008,42(4):631-643.
- [3] Wang Y,Xiao R,Yang F,et al. Abnormalities in cartilage and bone development in the Apert syndrome FGFR2(+/-S252W) mouse[J]. Development,2005,132(15):3537-3548.
- [4] 陈鹏,张波,张莉,等. FGFR2 持续增强对小鼠软骨成骨过程的影响[J]. 解放军医学杂志,2013,38(7):540-544.
- [5] Chen L,Li D,Li C,et al. A Ser252Trp[corrected] substitution in mouse fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) results in craniosynostosis[J]. Bone,2003,33(2):169-178.
- [6] Su N,Sun Q,Li C,et al. Gain-of-function mutation in FGFR3 in mice leads to decreased bone mass by affecting both osteoblastogenesis and osteoclastogenesis[J]. Hum Mol Genet,2010,19(7):1199-1210.
- [7] Jackson RA,Nurcombe V,Cool SM. Coordinated fibroblast growth factor and heparan sulfate regulation of os-

teogenesis[J]. Gene,2006,379:79-91.

- [8] Zhou YX,Xu X,Chen L,et al. A Pro250Arg substitution in mouse Fgfr1 causes increased expression of Cbfa1 and premature fusion of calvarial sutures[J]. Hum Mol Genet,2000,9(13):2001-2008.
- [9] Kreiborg S,Cohen MM. Characteristics of the infant Apert skull and its subsequent development[J]. J Craniofac Genet Dev Biol,1990,10(4):399-410.
- [10] Cohen MM,Kreiborg S. Suture formation,premature sutural fusion,and suture default zones in Apert syndrome[J]. Am J Med Genet,1996,62(4):339-344.
- [11] Ornitz DM. FGF signaling in the developing endochondral skeleton[J]. Cytokine Growth Factor Rev,2005,16(2):205-213.
- [12] Miraoui H,Oudina K,Petite H,et al. Fibroblast growth factor receptor 2 promotes osteogenic differentiation in mesenchymal cells via ERK1/2 and protein kinase C signaling[J]. J Biol Chem,2009,284(8):4897-4904.
- [13] 陈鹏,张波,张莉,等. FGFR2 持续增强对骨髓间充质干细胞软骨成骨影响[J]. 中华实验外科杂志,2012,29(12):2353-2356.
- [14] Raucci A,Laplantine E,Mansukhani A,et al. Activation of the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates fibroblast growth factor-induced growth arrest of chondrocytes[J]. J Biol Chem,2004,279(3):1747-1756.

(收稿日期:2014-10-08 修回日期:2014-12-10)