

骨折三期治疗对骨生长因子 FGF-2 表达影响的实验研究

孙永生,温建民,吴林生,李莉,韩凤岳,徐颖鹏,桑志成,胡海威,成永忠
(中国中医研究院骨伤科研究所,北京 100700)

摘要 目的:观察骨折三期治疗对 FGF-2 在骨折愈合过程中表达的影响。方法:168 只雄性 SD 大鼠随机取 6 只作为正常对照组,其余 SD 大鼠双胫骨上 1/3 段前部的中点造成 2 mm ×1.5 mm 的缺损。术后随机平均分为模型对照组、一期治疗组和三期治疗组,每组于不同的时间点分别处死 6 只,取材,常规组织学检查,免疫组化法检测标本中的 FGF-2,应用计算机图像分析系统进行定量分析。结果:缺损区内血肿细胞、炎性细胞、间充质细胞、成骨细胞、新形成骨细胞 FGF-2 表达呈强阳性,成熟骨细胞阴性或微弱阳性;骨折后三组 FGF-2 表达阳性细胞数和平均光密度值均即明显增高,但是,中药治疗组显著高于模型对照组($P < 0.05$),三期治疗组有高于一期治疗组的趋势,FGF-2 表达高峰出现时间中药治疗组显著早于模型组,三期治疗组较一期治疗组提前了 80%。结论:中药治疗能显著促进骨折愈合过程中 FGF-2 的表达,三期治疗明显强于一期治疗,因此对骨折进行分期辨证治疗是非常必要的。

关键词 骨折; 中草药; 成纤维细胞生长因子 2; 免疫组织化学

Experimental study of effects of the three-phase treatment in TCM for fracture on FGF-2 expression during fracture healing in rats SUN Yong-sheng, WEN Jian-min, WU Lin-sheng, LI Li, HANG Feng-yue, XU Ying-peng, SANG Zhi-cheng, HU Hai-wei, CHENG Yong-zhong. Institute of Orthopaedics and Traumatology, China Academy of Traditional Chinese Medicine (Beijing, 100700, China)

Abstract Objective: To observe the influence of three-phase treatment in TCM for fracture on FGF-2 expression during fracture healing in rats and to probe the effect of three-phase treatment for fracture in TCM and its modern medical mechanism. **Methods:** Among 168 male SD rats, 6 rats were taken randomly as normal group. In another rats, 2 mm ×1.5 mm defect model were made at the middle of the anterior part of the up-shaft of tibia. At first, 6 male SD rats Postoperatively, 162 male SD rats were divided randomly into three groups: the model control group, the one-phase treatment group and the three-phase treatment group, and then every group was divided randomly into 9 small groups, 6 rats in each small group. The rats in one-phase treatment group underwent TCM in 1 phase, those in three-treatment group in 3 phases and those in model control group saline at the same dose. On 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 21, 28 days after operation, a small group in each group were killed respectively. Specimens were prepared and examined histologically in routine. The expression of FGF-2 was detected by immunohistochemical staining and quantitatively analysed by computer image analysis system. **Results:** In different time points after operation, there was positive expression of FGF-2 in cells in hematoma, inflammatory cells, mesenchymal cells, osteoblasts and immature osteocytes in defect area while mature osteocytes showed negative or slightly positive. The mean optical density of the expression of FGF-2 obviously went up postoperatively, gradually increasing with development of fracture repair, reaching quickly peak during the formation of primary callus, and then rapidly decreasing, and returning by degrees to the normal level with remodelling of callus. However, mean optical density in the two group treated in TCM was significantly higher than that in the model control group ($P < 0.05$). Further, mean optical density in the three-phase treatment group should a higher tendency than that in the one-phase treatment group. The occurring time of peak of FGF-2 expression in the three-phase treatment went ahead of that of one-phase treatment at 80%. Change tendency of positive cell number was generally consistent with that of mean optical density. **Conclusion:** TCM

can greatly promote FGF-2 expression in fracture healing, and the three-phase treatment is notably stronger than the one-phase treatment in accelerating FGF-2 expression. It's very necessary to treat fracture with phases.

Key words Fractures; Drugs, Chinese herbal; FGF-2; Immunohistochemistry

为从分子生物学水平探讨骨折三期治疗的作用及其机制,本实验对骨折三期治疗与一期治疗(把骨折愈合的全过程作为一期进行治疗)对骨折愈合过程中骨折局部 FGF-2 表达的影响进行研究。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 SD 雄性健康大鼠,由北京市实验动物中心提供,SPF 级,体重(270 ± 20) g。动物实验室:中国中医研究院动物室,二级。实验用中药:同仁堂医药公司崇文门分公司提供。

1.2 主要仪器 手术器械:上海医疗器械厂生产。石蜡切片机:Reichert-Jung Histocut 820, West-Germany。生物组织自动脱水机:TS-12F,中国湖北省孝感市。光学显微镜:Olimpus Vanox 型, Olimpus Com. Japan。彩色图像分析仪: Mis-2000SP, Microimage Analysis System, USA 3Y-international Co. LTD。连接装有 Polaroid MDC Nikon 的显微镜。图像分析软件: Pixelpro, Ver. 4.0。

1.3 主要试剂 多聚甲醛:北京市化学试剂公司,批号:990106, Q/H82-0006-94。EDTA-Na₂:北京市化学试剂公司,批号:960923, GB1401-78。S-P 免疫组化染色试剂盒:北京中山生物技术有限公司提供, S-P 9001,批号:30577916。兔 bFGF 多克隆抗体: Santa Cruz Biotechnology, Inc,北京中山生物技术有限公司提供,批号: D0203。

1.4 建立骨折模型 于造模前 48 h 双下肢常规脱毛。以 0.3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉。在无菌手术下施术,双下肢常规消毒,于胫骨上段前正中,沿胫骨前嵴切口,长约 1.5 cm。依次切开皮肤和皮下组织,显露胫骨,于上 1/3 段中点,横行切开骨膜,造成宽 2 mm、深 1.5 mm 骨质缺损,生理盐水冲洗切口,逐层缝合。对骨折不作固定,自由活动,自由进食,自由摄水。

1.5 随机分组 将 168 只 SD 大鼠应用随机数字表随机的方法随机取 6 只作为正常对照组,其余造模后平均分为三期治疗组、一期治疗组与模型对照组,每组再按随机数字表随机的方法平均分为 9 个小组,每小组 6 只。动物分笼喂养,标准饲料。

1.6 干 预 方 法

1.6.1 基本方剂组成 本实验三期治疗组所用方剂是基于高等中医药院校统编教材《中医正骨学》中的肢伤一方、二方及三方^[1],各经加减而成:加减肢伤一方:当归 12 g 赤芍 12 g 桃仁 10 g 红花 6 g 黄柏 10 g 防风 10 g 乳香 5 g 生地黄 12 g 生甘草 6 g 等;加减肢伤二方:当归 12 g 赤芍 12 g 续断 12 g 威灵仙 12 g 生意仁 30 g 桑寄生 30 g 骨碎补 12 g 五加皮 12 g 等;加减肢伤三方:当归 12 g 赤芍 12 g 续断 12 g 威灵仙 12 g 骨碎补 12 g 川木瓜 12 g 生黄芪 15 g 熟地黄 15 g 煨自然铜 10 g(先煎) 土鳖 10 g 等。一期治疗组所用方剂是加减肢伤一方、二方与三方的综合方:红花 10 g 当归 12 g 赤芍 12 g 续断 12 g 骨碎补 12 g 煨自然铜(先煎) 10 g 生黄芪 15 g 熟地黄 15 g 炙甘草 6 g 等。

1.6.2 给药方法 按传统方法制成水煎剂,含生药 1.5 g/ml。经预实验观察最佳用药剂量为 2 倍等效剂量,以此为实验用药剂量。根据动物体重和体表面积确定给药量,分早晚 2 次,灌胃。所有实验动物均于造模 12 h 后给药或生理盐水。

1.6.3 SD 大鼠骨折分期 根据骨折愈合分期方法与 SD 大鼠骨折局部组织学变化,将骨折愈合过程分为三期:早期,即血肿机化演进期,骨折后 1~3 d;中期,即原始骨痂形成期,骨折后 4~14 d;后期,即改造塑形期,骨折后 15 d 以后。

1.6.4 三期治疗组 根据“中医治疗骨折三期”原则,分 3 期治疗:早期:活血化瘀、行气止痛,选用加减肢伤一方;中期:接骨续筋、舒筋活络,选用加减肢伤二方;后期:补益肝肾、强筋壮骨,选用加减肢伤三方。

1.6.5 一期治疗组 将骨折的早期、中期与后期合并为一期,选用加减肢伤一方、二方与三方的综合方治疗。

1.6.6 模型对照组 给予和实验组等量的生理盐水,灌胃,每日 2 次。

1.7 标本处理 分别于造模后 1、3、5、7、9、12、15、21 及 28 天,以断髓法每组各处死 1 小组大鼠,取出

胫骨,用质量分数为 40 g/L 的多聚甲醛 4 下固定 24 h,再经质量分数为 125 g/L EDTA-Na₂ 4 下彻底脱钙(一般 9~14 d,每 4 天换 1 次脱钙液),以骨折为中心取长 10 mm 的骨段,系列脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋。纵行切片,厚 6 μm。切片以 HE 染色和以 FGF-2 免疫组化染色进行组织学和免疫组织化学检测。

1.8 FGF-2 免疫组织化学检测

1.8.1 免疫组织化学染色(S-P 法) 石蜡切片常规脱蜡至水;滴加 3% H₂O₂,37 ,孵育 15 min,以消除内源性过氧化物酶的活性;蒸馏水洗涤 3 次,每次 5 min; PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;滴加正常羊血清,37 ,孵育 15 min,以封闭非特异性染色;滴加一抗(兔抗鼠 bFGF 多克隆抗体工作浓度 1:30),37 ,孵育 120 min; PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;滴加生物素标记羊抗兔 IgG,37 ,孵育 15 min; PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;⑩滴加辣根酶标记链霉卵白素(S-A/HRP),37 ,孵育 15 min;⑪ PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;⑫滴加显色剂 DAB-H₂O₂ 液,显色 15 min;⑬蒸馏水洗涤,终止显色反应;⑭常规梯度脱水、透明、加拿大中性树脂封片;⑮同时用一组织标本,以 PBS 代替一抗,作为阴性对照。

1.8.2 结果判断 细胞浆被染成棕黄色为 FGF-2 表达阳性,未显棕色者为阴性。在一般观察中,根据颜色的深浅将 FGF-2 表达阳性分为 4 级:微阳性(+)、弱阳性(++)、中度阳性(+++)、强阳性(++++)。根据阳性细胞平均光密度(MOD)值分级:微阳性(MOD 0.10)、弱阳性(0.10 < MOD 0.20)、中度阳性(0.20 < MOD 0.30)、强阳性(0.30 < MOD)。阴性对照结果为未显棕色。

1.9 图像分析

1.9.1 图像选取位置的确定 于骨折间隙内,分别于两骨折断端平齐原骨皮质的内、外缘,各取 1 视野,然后于骨折间隙的中心向两侧骨折断端方向各取 1 视野,共 6 个视野。

1.9.2 图像采集条件 显微镜的物镜固定为 ×40,光栅孔径为 0.25,光源电压为 9 mV,曝光时间为 0.16 s,色温为 5 500 K,敏感度为 M,分辨率为 1 600 ×1 200。

1.9.3 图像分析 采用 3Y 图像分析仪进行图像分析,FGF-2 表达阳性细胞记数与相应 MOD 测定。阳性细胞的确定条件:染色成棕黄色;细胞核比较清晰;形状比较规则;轮廓比较清楚。完全具备上述条件方确定为阳性表达细胞。图像周边压线的细胞不记数。细胞面积的范围:100~1e+009;FGF-2 表达 MOD 值的范围:-1e+009~1e+009。以每个切片 6 个视野的阳性细胞数之和代表该切片的阳性细胞数,6 个视野的总 MOD 之和为该切片阳性细胞 MOD 值。

1.10 数据处理 FGF-2 表达阳性细胞数与 MOD 值数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 Kruskal-Wallis test 方法进行检验, =0.05。

2 结果

2.1 正常对照组 FGF-2 表达的定位与定量 正常对照组个别的骨细胞 FGF-2 表达 + ~ ++,MOD 值 3.67OD,阳性细胞数 18 个。

2.2 骨折愈合过程中 FGF-2 表达定位的变化 在骨折愈合过程不同的时段,FGF-2 表达定位也随之发生相应的改变。骨折后 1~5 d 缺损区内血肿细胞和炎性细胞 FGF-2 染色阳性,以后间充质细胞、成骨细胞与新形成的骨细胞 FGF-2 表达 + + + +,随着时间的推移,编织骨逐渐向板层骨转变,骨细胞 FGF-2 表达的程度显著减弱,阳性细胞数也相应显著减少,当编织骨转化成板层骨时只有个别的骨细胞 FGF-2 表达呈 + ~ ++。

2.3 三期治疗、一期治疗与模型对照组骨折愈合过程中 FGF-2 表达定量 骨折后各组各时间点 FGF-2 表达阳性细胞平均光密度值见表 1。三期治疗组和一期治疗组各时间点 MOD 值的平均值显著高于模型对照组 (H = 5.993, P < 0.05) (见图 1-3),在骨

表 1 模型对照组、一期治疗组及三期治疗组各时间点 FGF-2 表达 MOD 值 (OD, $\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.1 MOD value of FGF2 expression in model control group,in one-phase treatment group and in three-phase treatment group in different time points after operation(OD, $\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	骨折后时间(d)								
	1	3	5	7	9	12	15	21	28
模型对照组	6.00 ±0.36	11.77 ±3.52	6.37 ±1.50	6.26 ±1.06	17.64 ±2.99	28.52 ±5.49	14.35 ±2.51	9.80 ±2.97	7.67 ±2.05
一期治疗组	12.97 ±2.13	14.75 ±5.71	24.81 ±10.92	19.70 ±0.46	28.00 ±17.32	17.80 ±5.18	30.98 ±9.64	7.44 ±2.20	12.88 ±2.13
三期治疗组	26.02 ±10.15	27.00 ±11.89	10.42 ±1.50	27.41 ±9.67	24.86 ±2.56	32.43 ±6.94	12.76 ±3.22	10.18 ±1.80	8.66 ±1.98

折早期(骨折后 1~3 d),三期治疗组和一期治疗组 MOD 值的平均值显著高于模型对照组 ($H = 8.667, P < 0.05$),在骨折早期及各时间点 MOD 值的平均值两方面,三期治疗组也有高于一期治疗组的趋势。每组以各时间点 FGF-2 表达阳性细胞数和 MOD 的平均值为基础,阳性细胞数和 MOD 值高于此基础的各时间点组成 FGF-2 表达高峰期,该期内最高阳性细胞数和 MOD 值称为 FGF-2 表达峰值。三期与一

期治疗组的 FGF-2 表达高峰期出现时间显著早于模型对照组,高峰持续时间显著长于模型对照组,其中三期治疗组高峰期出现时间比一期治疗组提前 4 d,提前了 80%,高峰持续时间比一期治疗组延长 1 d,延长了约 10%,峰值水平有三期治疗组高于一期治疗组、一期治疗组高于模型对照组的趋势。FGF-2 表达阳性细胞记数的变化趋势与 MOD 值的变化趋势基本一致,见表 2。

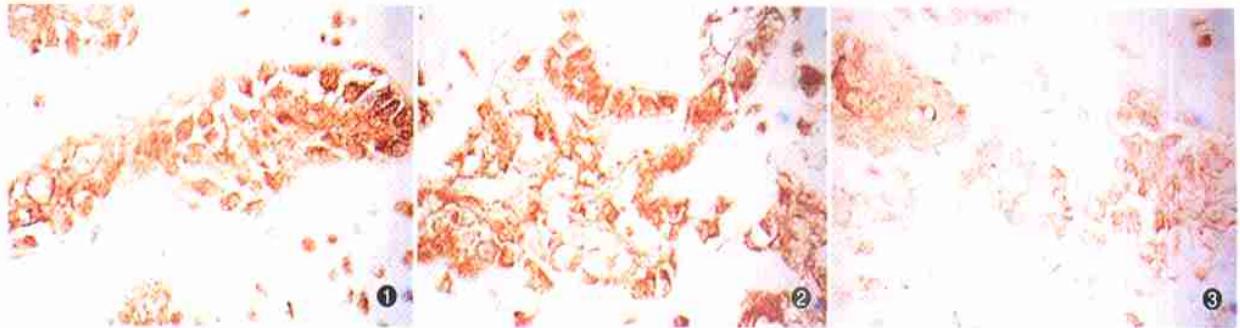


图 1 骨折后 12d,三期治疗组缺损区网织骨痂中成骨细胞 FGF-2 表达呈强阳性(++++)(S-P 法 × 400) 图 2 骨折后 12d,一期治疗组缺损区网织骨痂中成骨细胞 FGF-2 表达呈中度阳性(+++)(S-P 法 × 400) 图 3 骨折后 12d,模型对照组缺损区网织骨痂中成骨细胞 FGF-2 表达呈弱阳性(++) (S-P 法 × 400)

Fig.1 On 12th day after operation, osteoblasts in reticular callus in defect area showed strongly positive expression of FGF-2 in the three-treatment group(++++)(S-P method × 400) Fig.2 On 12th day after operation, there was mediumly positive expression of FGF-2 in osteoblasts in reticular callus in defect area in the one-treatment group(+++)(S-P method × 400) Fig.3 On 12th day after operation, FGF-2 expression of osteoblasts in reticular callus in defect area showed weakly positive in the model control group (++) (S-P method × 400)

表 2 模型对照组、一期治疗组及三期治疗组各时间点的 FGF-2 表达阳性细胞数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.2 Positive cell number of FGF-2 expression in model control group, in one-phase treatment group and in three-phase treatment group in different time points after operation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	骨折后时间(d)								
	1	3	5	7	9	12	15	21	28
模型对照组	25.83 ±1.60	46.17 ±1.60	24.17 ±5.42	25.17 ±5.29	63.00 ±10.53	117.00 ±25.34	58.83 ±9.78	39.00 ±10.70	32.00 ±7.35
一期治疗组	47.50 ±8.49	52.00 ±19.25	88.17 ±38.03	92.83 ±3.53	106.50 ±60.63	79.00 ±22.91	128.17 ±28.97	35.00 ±9.85	55.83 ±8.58
三期治疗组	89.50 ±33.06	99.83 ±44.64	39.50 ±5.57	111.50 ±37.75	115.50 ±13.85	135.00 ±31.83	55.50 ±12.05	44.00 ±7.93	37.83 ±8.34

3 讨论

3.1 对中医骨折三期治则的不同观点 骨折三期治则疗效已为临床实践所证实,但是对其作用及其机制的研究极少,且仅局限于临床疗效的初步观察^[2]。部分学者在临床工作中,将骨折的中期与后期合并为一期进行治疗,取得了一定的效果,从而提出中医骨折两阶段治疗的观点^[3]。有学者在临床与实验研究中将骨折的治疗不给予分期,也取得了一定的效果。又有学者将用于骨折中期与后期接骨续筋及补益肝肾类的中药用于骨折的早期,发现也能有效促进骨折局部骨生长因子基因的表达,加速骨折的愈合,从而对骨折的三期治疗原则提出疑问,认

为没有分期辨证治疗的必要。所以,目前骨折的治疗分期方法存在严重分歧,出现三期治疗、二期治疗及一期治疗的混乱局面,这样使骨折三期治疗的地位面临严峻的挑战,严重地制约着骨伤科学的发展。但是目前的研究多为临床疗效的观察,而且均是与空白对照组之间的比较,所以只能说明二期治疗及一期治疗也具有促进骨折愈合的作用,并不能说明二期治疗及一期治疗优于三期治疗。对骨折三期治疗作用及机制系统的实验研究,尚为空白。

3.2 骨折三期治疗对骨生长因子 FGF-2 表达的影响 局部骨生长因子对骨折修复起着关键的调节作用,决定着骨折修复的速度与质量。中医药治疗骨

折分子生物学方面的研究初步显示中药对胶原基因、BMP、IGF-1 及 TGF- β_1 的表达具有重要的调节作用^[4]。FGF-2 是广泛存在于机体组织的一种多聚肽,为广谱有丝分裂原,能促进来源于中胚层和神经外胚层细胞的分裂增殖^[5],具有趋化和迁移作用^[6],同时也促进毛细血管内皮细胞的分裂增殖,是一种毛细血管增殖刺激剂^[7],因而对促进骨形成细胞的分裂增殖及骨折组织血液循环的重建具有极其重要的作用。本实验结果示正常对照组仅个别的骨细胞 FGF-2 表达微弱阳性。三期治疗组和一期治疗组各时间点和骨折早期 FGF-2 表达阳性细胞数和 MOD 值的平均值显著高于模型对照组。三期治疗组与一期治疗组的 FGF-2 表达高峰期出现时间显著早于模型对照组,高峰持续时间显著长于模型对照组,峰值水平也高于模型对照组。此说明中药治疗能明显促进骨折局部 FGF-2 的表达。三期治疗组 FGF-2 表达阳性细胞数及平均光密度值高于一期治疗组,以早期更为明显,约达一期治疗组的 2 倍;三期治疗组 FGF-2 表达高峰期出现时间比一期治疗组提前 4 天,提前了 80%;高峰持续时间比一期治疗组延长 1 天,延长了约 10%,峰值水平也有高于一期治疗组趋势。此说明三期治疗对 FGF-2 表达的促进作用明显强于一期治疗。

3.3 骨折三期治疗对骨折愈合的作用及其机制

FGF-2 具有很强的促进间充质细胞、骨髓基质细胞、骨原细胞、成骨细胞、成软骨细胞的分裂增殖作用,

同时促进血管内皮细胞增殖,进而促进创伤局部血液循环的重建^[6,7],因而其对骨折的修复具有极其重要的促进作用。三期治疗对骨折愈合过程中 FGF-2 表达的促进作用明显强于一期治疗,所以三期治疗对骨折愈合的促进作用要强于一期治疗。骨折三期治疗与一期治疗的区别在于三期治疗根据骨折愈合的不同时期存在的不同病理证候而采取不同的治则,而一期治疗则将骨折愈合的整个过程作为一期,将骨折治疗的三大法则“活血化瘀、接骨续筋、补益肝肾”融为一体,整个疗程用药,一成不变,贯穿于骨折治疗的全过程。从此说明了中医分期治疗骨折的合理性和必要性。

参考文献

- 董福慧,朱云龙. 中医正骨学. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 1999. 35-41.
- 张海燕,刘定安,黄树明,等. 骨折三期用药的临床研究. 中国骨伤, 1999, 12(3): 46-47.
- 韩立军,王俊红,孙建国,等. 中药治疗骨折的两阶段学说及临床研究. 河北中医药学报, 2000, 15(1): 12-14.
- 刘献祥,余希杰,许书亮. 无名异冲剂在骨折愈合中对 DNA 和 BMP 含量影响的实验研究. 中国骨伤, 1999, 12(3): 21-23.
- 王海玲,王宇,王新春. 碱性成纤维细胞生长因子促进血管形成的研究进展. 哈尔滨医科大学学报, 2001, 35(3): 227-229.
- Radomsky ML, Thompson AY, Spiro RC, et al. Potential role of fibroblast growth factor in enhancement of fracture healing. Clin Orthop, 1998, 355(suppl): s283-293.
- Gong ZY, Zhou SX, Gu XM, et al. Effect of recombinant human basic fibroblast growth factor on angiogenesis during mandible fracture healing in rabbits. Chin J Traumatol, 2003, 6(4): 242-244.

(收稿日期:2003-12-17 本文编辑:李为农)

2004 海峡两岸创伤医学论坛暨第 11 届全国创伤学术交流征文通知

为了提高我国创伤医学临床救治和基础研究水平、繁荣学术,以及促进海峡两岸的学术交流和合作,中华医学会创伤学分会、《中华创伤杂志》编辑部定于 2004 年 8 月 22 日 - 24 日在乌鲁木齐市联合召开 2004 海峡两岸创伤医学论坛暨第 11 届全国创伤学术交流会。本次会议除进行大会交流外,届时将邀请 40 余位台湾及大陆创伤医学界知名专家讲学,争鸣答疑。

1 征文内容: 创伤急救的实施及模式探讨; 多发伤的救治; 颅脑伤、四肢脊柱伤、胸腹伤等部位伤的救治; 交通伤的临床与基础研究; 组织修复、组织工程等创伤基础研究。

2 要求: 未曾发表过论文的 500 字以内摘要 1 份,论文应具有科学性、先进性和实用性; 按结构式摘要撰写,顺序为文题、作者单位及邮政编码、姓名、目的、方法、结果、结论; 请寄打印稿并加盖公章,同时附该文软盘(Word 格式),自留底稿不退稿。欢迎通过 E-mail 投稿。

3 优秀论文评选:拟参加青年优秀论文评选者(45 岁以下),除寄摘要外,需附全文 1 份,并另纸注明第一作者的年龄、职称及职务。符合本刊要求的获奖论文优先在本刊发表。

4 证书颁发:参加会议者,将颁发国家级继续教育项目学分证书和中华医学会论文证书。

5 收稿地点:来稿请寄重庆市渝中区大坪长江支路 10 号《中华创伤杂志》编辑部向勇主任收 邮政编码:400042 电话:(023)68757524,68818654 传真:(023)68818654 E-mail:cmachz@public.cta.cq.cn 信封上请注明“创伤会议”。

6 截稿日期:2004 年 6 月 20 日前(以当地邮戳为准),逾期不予受理。