

合并脑损伤时骨折愈合过程中血管内皮细胞生长因子的表达*

吴成龙¹, 关 键², 宋永周¹, 冯国君¹, 马 维¹

Expression of vascular endothelial growth factor in fracture healing rats combined with brain injury

Wu Cheng-long¹, Guan Jian², Song Yong-zhou¹, Feng Guo-jun¹, Ma Wei¹

Abstract

BACKGROUND: Many clinical cases demonstrated that the callus number was obvious increased, and the bone healing was faster in fracture patients combined with brain injury. However, there is not a prospective control study underlying the effects of vascular endothelial growth factor (VEGF), and the mechanism is unclearly.

OBJECTIVE: To explore the changes of VEGF expression in SD rats fracture healing combined with brain injury and fracture only.

METHODS: SD rats were randomly divided into 3 groups: normal control, simple fracture and fracture combined with brain injury groups. Rat diffuse midrange brain injured model was prepared by using modified Marmarou installation method. In addition, rat fracture model was prepared as follow: Knee joint of left lower extremity was depilated and sterilized, Condyles of tibia was perforated, shin bone was fractured transversally in above 1/3 of shin bone. The reparative process and effect of fracture were observed by X-ray films; and VEGF expression in the Osteotylus samples were detected by RT-PCR and immunohistochemistry staining.

RESULTS AND CONCLUSION: There were no obviously differences between the simple fracture and fracture combined with brain injury groups at days 3, 7 and 14 after fracture. Compared to the simple fracture group, the fracture lines of the brain injury combined fracture group have become blurred, and formed a great quantity osteotylus surrounding the fracture parts at day 24, and the fracture lines disappeared after 42 days, the fracture has basically healed. In the simple fracture group, the expression of VEGF appeared at day 7, gradually increased, reached a peak at week 3, but disappeared after 42 days. In the brain injury combined fracture group, the expression of VEGF appeared at day 3, and reached a peak 2-3 weeks later. Its peak expression was early and lasted for a longer time. It demonstrated that the bone healing was faster in fracture rat combined with brain injury, namely, brain injury has promoted effect on fracture healing, which may relevant to longer persistence time and ahead of schedule of VEGF expression.

Wu CL, Guan J, Song YZ, Feng GJ, Ma W. Expression of vascular endothelial growth factor in fracture healing rats combined with brain injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(28): 5181-5185.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 大量临床病例显示, 骨折合并脑损伤患者骨痂量明显增多, 骨折愈合速度明显加快。但对合并脑损伤时骨折愈合过程中血管内皮细胞生长因子的表达及作用机制缺乏前瞻性对照研究, 对其潜在的机制尚未阐明。

目的: 对比观察 SD 大鼠在骨折合并脑损伤以及单纯骨折时骨折愈合过程中骨痂内血管内皮细胞生长因子的表达变化。

方法: 将 SD 大鼠以数字表法随机分为 3 组: 正常对照组、单纯骨折组、骨折合并脑损伤组。脑损伤模型采用改进的 Marmarou 自由落体装置撞击大鼠颅骨制作弥漫性中度脑损伤模型; 于左侧胫骨髌间处钻孔, 插入无菌克氏钢针, 在胫骨中上 1/3 处横向折断胫骨, 制作骨折模型。术后 X 射线摄片观察骨折修复过程和效果; RT-PCR 检及免疫组化染色观察骨痂标本血管内皮细胞生长因子表达。

结果与结论: 骨折后 3, 7, 14 d, 单纯骨折组、骨折合并脑损伤组 X 射线表现无明显差别。与单纯骨折组相比, 骨折后 24 d 脑损伤合并骨折组骨折线变得模糊, 形成较多骨痂量; 42 d 后骨折线消失, 伤肢基本愈合。单纯骨折组骨痂中血管内皮细胞生长因子骨折后 7 d 开始出现, 表达逐渐增强, 约 3 周时达高峰, 42 d 已经不见血管内皮细胞生长因子表达; 脑损伤合并骨折后 3 d 即可见血管内皮细胞生长因子表达, 两三周达高峰期, 其表达高峰提前且持续时间较长。说明脑损伤后大鼠骨折愈合加速, 骨痂量增多, 表明脑损伤对骨折愈合有促进作用, 这可能与脑损伤后大鼠体内生长因子血管内皮细胞生长因子表达高峰提前且持续时间较长有关。

关键词: 大鼠; 动物模型; 中枢神经损伤; 骨折; 愈合; 血管内皮细胞生长因子; 组织构建

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.28.012

吴成龙, 关键, 宋永周, 冯国君, 马维. 合并脑损伤时骨折愈合过程中血管内皮细胞生长因子的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(28):5181-5185. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China; ²The Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Wu Cheng-long★, Studying for master's degree, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China chlongwu1015@sohu.com

Correspondence to: Ma Wei, Professor, Master's supervisor, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China mw0632@sohu.com

Received: 2010-01-07
Accepted: 2010-03-14

¹ 河北医科大学第二医院, 河北省石家庄市 050000;
² 石家庄市第三医院, 河北省石家庄市 050000

吴成龙★, 男, 1976年生, 安徽省桐城市人, 汉族, 河北医科大学在读硕士, 主要从事骨科创伤方面研究。
chlongwu1015@sohu.com

通讯作者: 马维, 教授, 硕士生导师, 河北医科大学第二医院骨科, 河北省石家庄市 050000
mw0632@sohu.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)28-05181-05

收稿日期: 2010-01-07
修回日期: 2010-03-14
(20090917021/GW-Z)

0 引言

血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是一种特异性作用于血管内皮细胞的生长因子^[1], 研究发现单纯脑损伤和单纯骨折情况下均有 VEGF 的表达, 且作用机制已有所了解。大量的临床病例显示, 骨折合并脑损伤患者骨痂量明显增多, 骨折愈合速度明显加快。但对合并脑损伤时骨折愈合过程中 VEGF 的表达及作用机制缺乏前瞻性对照研究, 对其潜在的机制尚未阐明。

本实验旨在通过建立大鼠弥漫性中度脑损伤模型和骨折模型, 应用免疫组织化学和 RT-PCR 方法, 观察比较 SD 大鼠在骨折合并脑损伤以及在单纯骨折时, 骨折愈合的过程中骨痂内血管内皮细胞生长因子 VEGF 的表达变化; 探讨 VEGF 在大鼠骨折合并脑损伤后的骨折加速愈合中的作用机制, 以期为临床选择性地应用 VEGF 基因疗法治疗难治性骨折提供理论依据。

1 材料和方法

设计: 前瞻性随机对照观察实验。

时间及地点: 于 2006-06/2009-01 在河北医科大学第二医院骨科实验室完成。

材料:

实验动物: 清洁健康雄性 SD 大鼠 66 只, 体重 350~400 g, 购自河北医科大学动物中心, 以数字表法随机分为 3 组: 正常对照组 ($n=6$)、单纯骨折组 ($n=30$)、骨折合并脑损伤组 ($n=30$)。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

主要仪器:

仪器	来源
OHBA SIKI 打击器	Tokyo, Japansh
定量 PCR 仪 (ABI15700 型)	美国 ABI 公司
凝胶成像系统 (FOTODYNE 型)	美国 Image 公司
低温高速离心机 (SCR20B)	日本 HITACHI 公司
电泳仪 (DF-Cu 型)	北京六一仪器厂

实验方法:

模型制作: 脑损伤模型采用改进的 Marmarou 自由落体装置撞击大鼠颅骨制作弥漫性中度脑损伤模型^[2]: 颅顶部正中 2 cm×2 cm 手术区域剪除毛发, 无菌条件下剪开大鼠脑顶部头皮, 分离骨膜, 在前凶与后凶连线中

点用 502 粘连剂固定钢垫, 将大鼠固定在海绵垫上, 使 400 g 的铁锤自 1.75 m 高度落下, 撞击正下方的钢垫, 致伤后取下钢垫, 缝合创口。

骨折模型制造方法: 于左侧下肢膝关节处脱毛、消毒, 纵向剪开皮肤, 暴露并剥离膝关节韧带, 在胫骨髁间处钻孔, 沿髓腔方向插入直径约 2.5 mm 的无菌克氏钢针。在胫骨中上 1/3 处钝性剥离肌肉筋膜, 横向折断胫骨, 逐层关闭切口。

SD 大鼠编号称质量后, 用 10% 水合氯醛腹腔注射 (3 mL/kg), 麻醉生效后, 固定于特制手术台上。手术过程均在严格无菌条件下进行, 术后放置于笼中自由活动、随意进食水。正常对照组不做任何处理。

X 射线观察: 单纯骨折组和骨折合并脑损伤组动物, 分别于术后第 3, 7, 14, 24, 42 天各处死 6 只并在 60 kV, 7 mA, 0.037 s, 50 cm 的照射条件下进行 X 射线摄片, 以观察骨折修复过程和效果。

反转录聚合酶链反应 (RT-PCR): 分别于术后第 3, 7, 14, 24, 42 天各处死动物 6 只。在无菌操作下距骨折断端大约 1 cm 处截取骨痂标本, 取其中一半迅速去除软组织, Trizol 法裂解细胞, 提取细胞总 mRNA, 反转录合成 cDNA。以 β_2 -microglobulin 基因为内参将不同时间段的产物进行 PCR 扩增。VEGF 因子上游引物为 5' AGA AAG CCC ATG AAG TGG TG 3', 下游引物为 5' ACT CCA GGG CTT CAT CAT TG 3', 扩增产物长度为 177 bp。 β_2 -microglobulin 基因上游引物为 5' TGT GCT ATG TTG CCC TAG ACT 3', 下游引物为 5' TCG TAC TCC TGC TTG CTG AT 3', 扩增产物长度为 442 bp。PCR 结束后, 用琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 在紫外灯下观察目的条带, 并摄影记录。

免疫组织化学染色图像分析: 采用 HPIAS-1000 病理图文分析系统, 对各组切片中 VEGF 的着色灰度进行定量测量, 有棕黄色颗粒者为阳性部位, 每张切片中取 10 个高倍视野, 计算其灰度的平均值。

主要观察指标: 骨折愈合情况及 VEGF 表达。

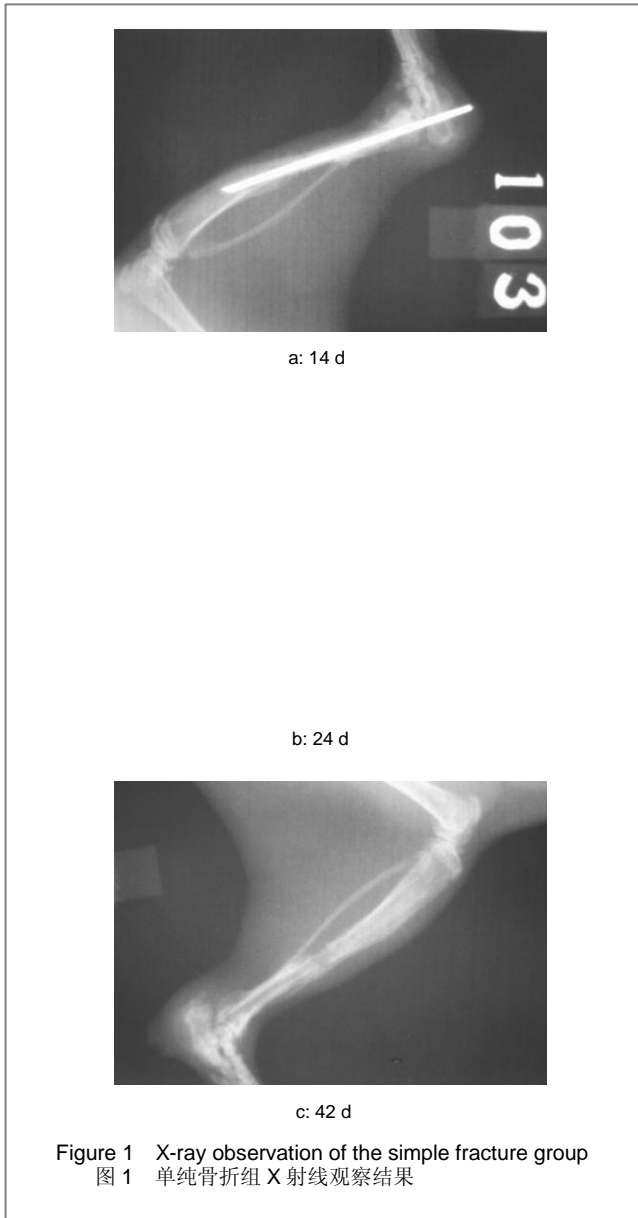
设计、实施、评估者: 实验设计为第一、二作者, 实施为第一、二、三、四、五作者, 评估为第二作者, 均经过系统培训。

统计学分析: 由第一作者采用 SPSS 10.0 统计学软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 66只大鼠均进入结果分析。

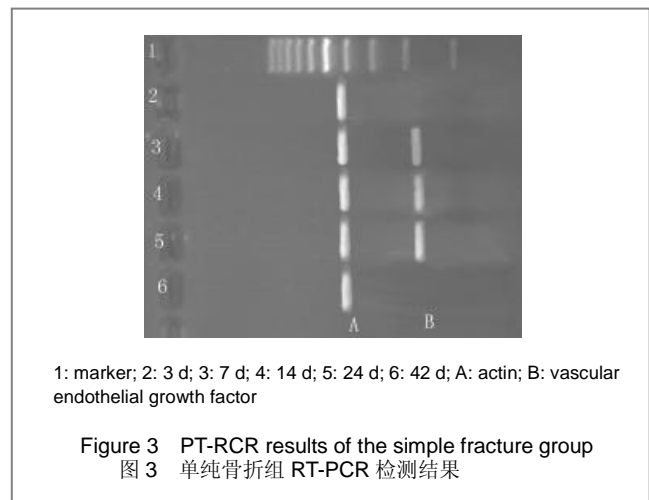
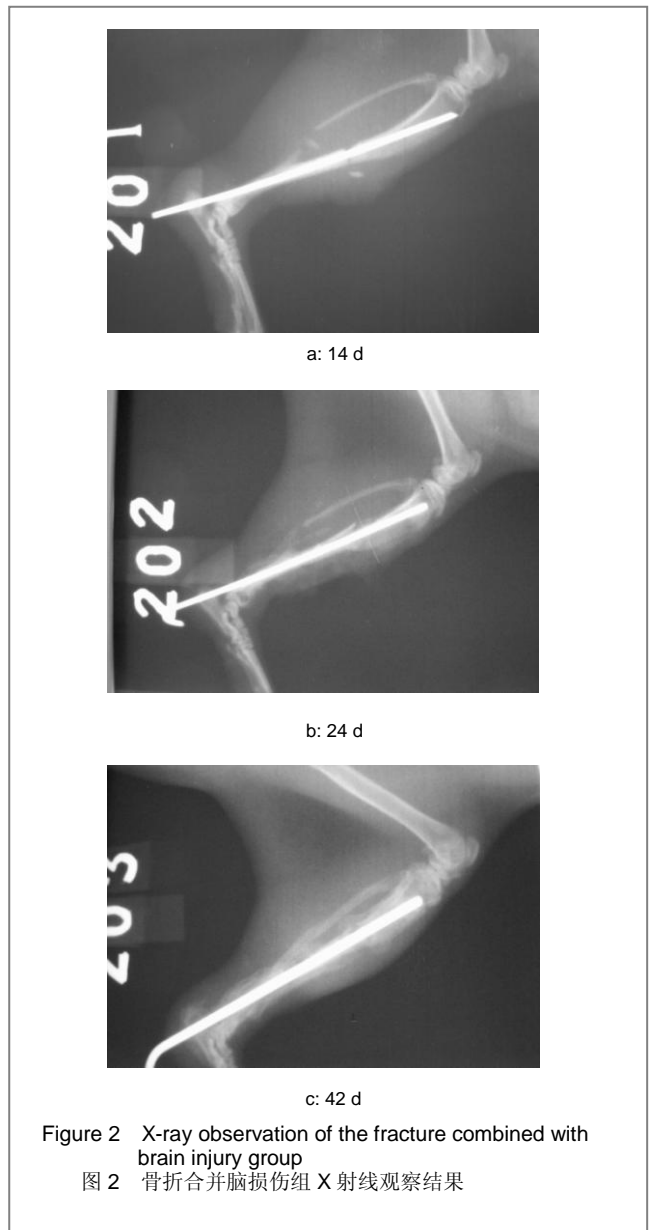
2.2 各组X射线观察结果 单纯骨折组, 骨折后3, 7, 14 d骨折线清晰, 未见骨痂形成, 见图1a; 24 d骨折线较清晰, 有骨痂形成, 量较少, 图1b; 42 d骨折线模糊, 仍隐约可见, 骨折周围有大量骨痂形成, 图1c。



骨折合并脑损伤组, 骨折后3, 7, 14 d骨折线清晰, 未见骨痂形成, 见图2a; 24 d骨折线变得模糊, 骨折周围有较多骨痂形成, 见图2b; 42 d骨折线消失, 伤肢已基本愈合, 骨折周围可见大量骨性骨痂形成, 局部增粗, 骨密度较高, 见图2c。

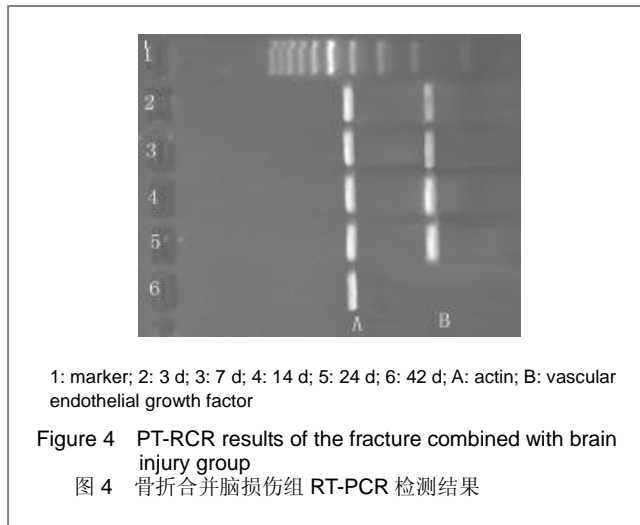
2.3 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测结果 单纯骨折组, 骨折后3 d, 未见有明显VEGF的表达; 在骨折后7 d开始出现VEGF的表达且持续至24 d时, 至42 d

已经见不到VEGF的表达, 见图3。



骨折合并脑损伤组, 骨折后3 d即开始出现VEGF的

表达, 此后表达逐渐增强, 持续到24 d。至42 d已经见不到VEGF的表达, 见图4。



2.4 免疫组织化学染色图像分析 见表1。

表1 单纯骨折组及骨折合并脑损伤组 VEGF 灰度值检测结果
Table 1 Detection of gray scale of vascular endothelial growth factor in each group (x±s)

Time	Simple fracture group	Fracture combined with brain injury group
3 d	0	124.02±13.88 ^a
7 d	125.40±12.60	140.29±18.31 ^a
14 d	139.35±13.55	147.57±19.17 ^a
24 d	150.89±2 521	152.03±12.81
42 d	0	0

^aP < 0.01, vs. simple fracture group

统计分析结果显示: 单纯骨折组VEGF表达从7 d开始出现, 持续到3周左右达高峰; 骨折合并脑损伤组VEGF表达3 d开始出现, 14 d达高峰, 并持续到24 d左右。在3, 7 d时, 骨折合并脑损伤组VEGF表达较单纯骨折组显著增高(P < 0.01); 在14 d时, 骨折合并脑损伤组VEGF表达较单纯骨折组增高(P < 0.01); 至24 d时, 骨折合并脑损伤组和单纯骨折组VEGF表达无明显区别(P > 0.05)。

3 讨论

血管内皮细胞生长因子是1989年首先被Ferrara等从牛垂体滤泡星状细胞体外培养液中纯化而得到的一类糖蛋白, 相对分子质量为34 000~45 000 [3]。VEGF可在很多正常成人和动物组织中表达, 但一般水平较低[4]。

VEGF通过选择性与血管内皮细胞膜上的两种酪氨酸受体(FLT-1和KDR)特异性高亲和力结合后形成的二聚体, 可发挥一系列生物学作用, 从而达到血管的维持功能[5-6]。由于VEGF特异的促血管再生作用, 学者们开始尝试应用VEGF治疗一些疾病, 并取得一些进展。Takeshita等[7]将VEGF165注射到兔缺血下肢的髂动脉

内, 通过血管造影及组织切片发现侧枝循环较对照组增加, 血液动力学明显改善。由于VEGF蛋白质在机体内很快被降解, 不能持续发挥作用, 因此Isner等[8]及Baumgartner等[9]利用含有VEGF165的真核表达质粒转染机体治疗下肢缺血性疾病, 取得良好效果, 发现侧枝循环明显增加, 血液动力学明显改善, 目前已开始进行临床试验。杨述华等[10]利用VEGF基因转染促进伤口肉芽组织生长, 发现肉芽组织内血管生长增多, 肉芽组织厚度增加。

Aronson[11]通过对兔胫骨骨折模型的观察证实骨折端血流较非骨折端大9倍。Trueta等[12]在研究骨髓血管形成与软骨内骨化时也证实骨形成高度依赖于血氧的供给。可以确信, 在骨折愈合的过程中血管形成和血氧供给起着重要的调节作用。

而VEGF在骨折愈合过程中的血管内生过程中发挥了重要作用, 并介此直接或间接影响血管再生的各个环节[13]: VEGF通过自分泌或旁分泌与血管内皮细胞表面受体结合, 促进内皮细胞增殖, 诱导新生血管形成[14]。其次, 成骨细胞上有VEGF的flt-1受体, VEGF通过作用于成骨细胞上表达的flt-1受体而使其发生趋化作用[15-18], 促进骨折愈合。

骨折后早期(3~7 d)骨折局部由于出血, 组织细胞坏死, 炎性细胞反应引起了血流中断, 此时的VEGF表达量较弱。随着骨折的修复, 肉芽组织的生长加快使得血供相对减少, 氧分压降低, 低氧强烈诱导VEGF的表达[19]。骨痂中的巨噬细胞、血小板、软骨细胞及间充质细胞通过旁分泌或自分泌方式产生该细胞因子。使VEGF与其他血管生成因子共同促进血管内皮细胞增殖、分化和血管形成。血管生成可将损伤修复所需的营养物质与生骨因子等输送到骨折部位, 同时把代谢产物带离骨折部位。大约在骨折后3周VEGF mRNA表达量达到高峰。此时恰为软骨细胞合成高峰期, VEGF在软骨内成骨过程中协调着软骨细胞向骨细胞的转化、破骨细胞等[20-22]。它们通过适当的氧张力、压力、营养、生长与分化因子共同促进骨形成。在骨修复的后期, VEGF mRNA的表达呈平稳下滑趋势, 这可能是由于随着局部环境的改善, 低氧状态得以纠正, 间充质细胞及软骨细胞逐渐分泌VEGF减少, 而成骨细胞在后期表达VEGF也趋平稳[23]。

在临床工作中, 作者发现脑损伤合并骨折患者骨折愈合明显加快, 骨痂形成量明显增多。早在1960年Gibson就首次报道了合并脑损伤股骨骨折的治疗, 发现骨折处有大量骨痂形成。随后有关脑损伤与骨折愈合的报道逐渐增多。Spencer等[24]发现, 单纯骨折者表现为典型的骨折愈合过程, 骨痂呈梭形向外膨胀; 而脑损伤并骨折者骨痂外层最先出现放射性密度, 组织学检查发现外层骨痂最先成熟, 与正常骨折愈合呈相反过程, 却与异位骨化类似, 因而认为这实际上是异位骨化的一种

形式。Kim等^[25]证实合并脑损伤的大鼠股骨干骨折愈合时间为14 d, 而单纯股骨干骨折愈合需要28 d; 而且合并脑损伤组骨痂数量较对照组明显增多。本实验X射线片结果证实合并脑损伤后, 与单纯骨折组相比, 骨折愈合加快, 与上述结论一致。

关于脑损伤后促进骨折愈合的机制, Bidner等^[26]报告脑损伤患者血清能促进大鼠成骨细胞有丝分裂和生长, 并有剂量依从性。此外还有研究表明, 单纯脑损伤患者无论是在mRNA的水平还是在蛋白质水平VEGF均有过量的表达^[27-28]。本实验通过RT-PCR检测及免疫组织化学染色和图像分析提示: 合并脑损伤时, 提示VEGF可能提早启动了骨折修复的进程, 并作为骨折修复过程中一个很关键的因子参与了骨折愈合。考虑脑损伤后VEGF提早启动骨折修复进程与下列因素有关^[29-33]: ①脑损伤后由于血脑屏障的破坏, 受损脑组织直接释放VEGF进入血循环, 作用于骨折局部而起作用。②中枢神经系统损伤后对外周组织产生神经刺激, 导致骨折附近组织以旁分泌方式释放VEGF。③脑损伤累及脑垂体导致脑垂体神经分泌功能失常。④虽然脑损伤未直接累及脑垂体, 脑垂体对相邻受损脑组织产生反应, 导致分泌失常。⑤脑损伤后血清中促成骨活性因素抑制物水平下降, 导致成骨活性相对增强。⑥脑损伤后长期制动可引起废用性骨质减少, 骨基质衍生活因子反应性释放增加, 刺激骨质增生。

4 参考文献

- [1] Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;161(2):851.
- [2] Marmarou A, Montasser A, Foda A, et al. A new model of diffuse brain injury in rats. *J Neurosci.* 1994;296:654-673.
- [3] Connolly DT, Heavelman DM, Nelson R, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest.* 1989; 84(5):1470.
- [4] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997;18(1):4-25.
- [5] Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995;146(5):1029-1039.
- [6] Dolecki GJ, Connolly DT. Effects of a variety of cytokines and inducing agents on vascular permeability factor mRNA levels in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;180(2):572-578.
- [7] Takeshita S, Zheng LP, Kearney M, et al. Therapeutic angiogenesis: a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest.* 1994; 93(2): 662-670.
- [8] Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet.* 1996; 348(9024): 370-374.
- [9] Baumgartner I, Pieczek A, Manor R, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation.* 1998; 97(12):1114-1123.
- [10] Yang SH, Zhou YC, Yang C, et al. *Zhonghua Guke Zazhi.* 2001; 21(5):301-304.
杨述华, 周迎春, 杨操, 等. 血管内皮生长因子基因转染促进伤口愈合实验研究[J]. *中华骨科杂志*, 2001, 21(5): 301-304.
- [11] Aronson J. Experimental and clinical experience with distraction osteogenesis. *Cleft palate Craniofac.* 1994;31(6):473.
- [12] Trueta T, Amato V. The vascular contribution to osteogenesis: charges in the growth cartilage caused by experimentally induced ischemia. *J Bone Joint Surg Br.* 1960;42(4):571.
- [13] Street J, Bao M, deGuzman L, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2002;99(15):9656-9661.
- [14] Uchida S, Sakai A, Kudo H, et al. Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone.* 2003;32(5):491.
- [15] Abramovitch R, Neeman M, Reich R, et al. Intercellular communication between vascular smooth muscle and endothelial cells mediated by heparin-binding epidermal growth factor like growth factor and vascular endothelial growth factor. *FEBS Letters.* 1999;425(4):441.
- [16] Midy V, Plowt T, Pei D, et al. Vascular endothelial growth factor induce differentiation in cultured osteo blasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;199(2):380.
- [17] Li G, McIlmurray L, Wang H. rhBMP-2, rhVEGF165, rhPTN and thrombin-related peptide, TP508 induce chemotaxis of human osteoblasts and microvascular endothelial cells. *J Orthop Res.* 2005;23(3):680-685.
- [18] Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone.* 2002;30(3):472.
- [19] Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saodechp B, et al. Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts in vitro. *Plast Reconstr Surg.* 1999;104(3):738.
- [20] Kaspar D, Neidlinger-Wilke C, Holbein O, et al. Mitogens are increased in the systemic circulation during bone callus healing. *J Orthop Res.* 2003;21:320-325.
- [21] Park SH, O'Connor KM, McKellop HA. Interaction between active motion and exogenous transforming growth factor Beta during tibial fracture repair. *J Orthop Trauma.* 2003;17(1):2-10.
- [22] Szczesny G. Molecular aspects of bone healing and remodeling. *Pol J Pathol.* 2002;53(3):145-153.
- [23] Streeten EA, Brandt ML. Biology of bone endothelial cells. *Bone Miner.* 1990; 10(2):85.
- [24] Spencer RF. The effect of head injury on fracture healing. A quantitative assessment. *J Bone Joint Surg(Br).* 1987;69:525-528.
- [25] Kim KH, Kim HS, Moon SH, et al. Animal model and gene expression analysis during the accelerated fracture healing in traumatic brain injury. *J Korean Orthop Res Soc.* 2003;6(2):177-185.
- [26] Bidner SM, Rubins IM, Desjardins JV, et al. Evidence for a humoral mechanism for enhanced osteogenesis after head injury. *J Bone Joint Surg(Am).* 1990;72:1144-1149.
- [27] Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol.* 2000;156(3):965.
- [28] Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, et al. VEGF mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol.* 1998;152(6):1445.
- [29] Khare GN, Gautam VK, Gupta LN, et al. A new hypothesis for faster healing of fractures in head injured patients. *Indian J Med Sci.* 1995; 49: 281-284.
- [30] Newman RJ, Stone MH, Mukherjee SK. Accelerated fracture union in association with severe head injury. *Injury.* 1987;18:241-246.
- [31] Yao JH, Shi SS, Li YF, et al. *Zhongguo Jiaoxing Waikexue Zazhi.* 2000; 7(10):996.
姚建华, 时述山, 李亚非, 等. 神经生长因子对骨折愈合影响的研究进展[J]. *中国矫形外科杂志*, 2000, 7(10): 996.
- [32] Lian K, Du JY. *Zhongguo Jiaoxing Waikexue Zazhi.* 2001;8(11):1084.
廉凯, 杜靖远. 降钙素基因相关肽对鼠成骨细胞IGF-1及IGF-1RmRNA表达的影响[J]. *中国矫形外科杂志*, 2001, 8(11): 1084.
- [33] Bidner SM, Rubins IM, Desjardins JV, et al. Evidence for a humoral mechanism for enhanced osteogenesis after head injury. *J Bone Joint Surg(Am).* 1990;72:1144-1149.