

根据 I 型胶原氨基末端肽、I 型胶原羧基末端肽、骨钙素及骨特异性碱性磷酸酶早期诊断骨不连

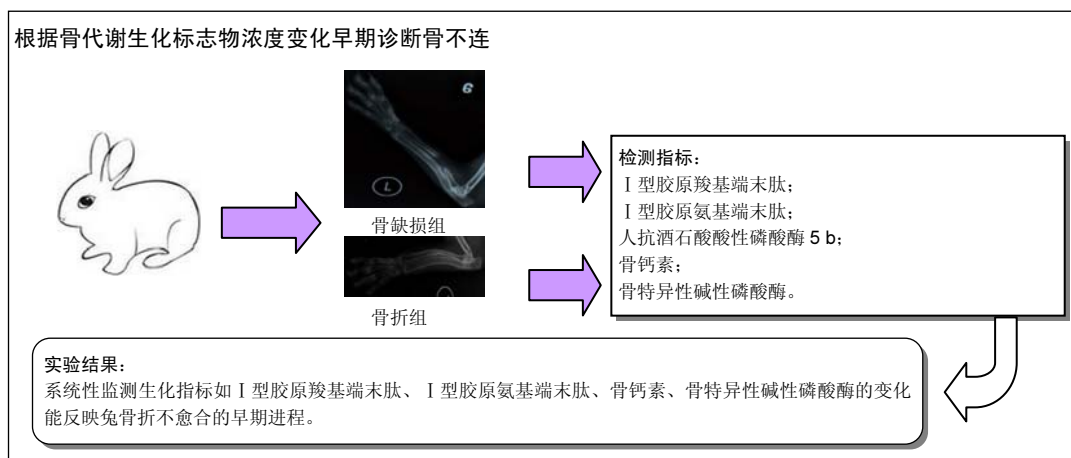
王清华¹, 林坚平², 沈宁江², 史占军³, 周 钢², 吴多能²(海南省人民医院, ¹外科, ²关节外科, 海南省海口市 570311; ³南方医科大学南方医院关节外科, 广东省广州市 510515)

引用本文: 王清华, 林坚平, 沈宁江, 史占军, 周钢, 吴多能. 根据 I 型胶原氨基末端肽、I 型胶原羧基末端肽、骨钙素及骨特异性碱性磷酸酶早期诊断骨不连[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(51):7611-7621.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.51.002

ORCID: 0000-0001-8276-2460(王清华)

文章快速阅读:



王清华, 女, 1974 年生, 海南省海口市人, 汉族, 2005 年江西医学院毕业, 副主任护师, 主要从事外科临床、骨愈合方面的研究。

通讯作者: 林坚平, 博士, 主任医师, 海南省人民医院关节外科, 海南省海口市 570311

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)51-07611-11

稿件接受: 2016-09-28

文题释义:

骨不连: 正常骨骼的代谢处于动态平衡之中, 成骨过程和破骨过程紧密耦联, 而骨不连患者的这一动态平衡被破坏, 骨吸收大于骨形成, 最终形成骨不连, 如果能够通过测量骨代谢生化标志物浓度从而有效地对骨代谢过程进行监测, 就有可能为早期诊断骨不连提供依据。

骨特异性碱性磷酸酶: 是骨生长过程中持续释放时间最长的细胞因子, 并且还具有组织特异性强、时间变异性小的特点。其由成骨细胞产生, 是碱性磷酸酶的亚型, 存在于成骨细胞膜结合物。骨特异性碱性磷酸酶是反映骨形成和成骨细胞活性的敏感和特异指标, 能排除肝、肾、肠等疾病影响, 是成骨细胞的胞外酶, 成骨细胞活性增强, 则骨特异性碱性磷酸酶分泌增加。

摘要

背景: 对血液中骨代谢标志物的浓度进行检测以对骨折愈合情况进行评估具有使用简单、创伤小、变异小的特点, 如何找到一种合适的标志物以预测骨不连的发生是当前该领域研究的热点。

目的: 建立骨折不愈合动物模型, 探讨实验性骨折不愈合的生化指标变化规律。

方法: 选取五六月龄纯种新西兰大白兔 20 只, 随机均分为 2 组, 骨缺损组在左前臂桡骨中段截除 1.5 cm (包括骨髓), 骨断端用骨蜡封闭髓腔; 骨折组只是在左前臂桡骨中段造成骨折。2 组分别于术前、术后 2-8, 10, 12 周进行前臂的 X 射线片检查观察桡骨缺损区愈合情况, 并抽取血清采用生物素双抗体夹心 ELISA 法检测骨吸收特异标志物(包括 I 型胶原羧基末端肽、I 型胶原氨基末端肽、人抗酒石酸酸性磷酸酶 5b) 及骨形成特异标志物(包括骨钙素、骨特异性碱性磷酸酶)的表达变化。

结果与结论: ①分析 2 组手术前后骨代谢指标的变化发现, 骨缺损组骨代谢一直持续在较高水平, 骨不连早期诊断的临床预测可以依赖于多个血清生化指标的同时跟踪监测; ②除人抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 意义不大之外, 骨缺损组中 I 型胶原羧基末端肽在术后第 5 周均值最高, 骨钙素、骨特异性碱性磷酸酶、I 型胶原氨基末端肽在术后 4 或 5 周均值明显下降, 可以说明 I 型胶原羧基末端肽、I 型胶原氨基末端肽、骨钙素、骨特异性碱性磷酸酶能快速随骨形成和骨吸收而迅速改变, 敏感地反映体内骨代谢的具体状态; ③系统性监测生化指标如 I 型胶原羧基末端肽、骨钙素、骨特异性碱性磷酸酶、I 型胶原氨基末端肽的变化能反映兔骨折不愈合的早期进程, 它们是否均可以作为反映骨吸收与骨形成的敏感性、特异性较强的指标, 是否可以早期诊断兔骨不连, 需要进一步深入探讨。

Wang Qing-hua, Associate
chief nurse, Department of
Surgery, Hainan Central
Hospital, Haikou 570311,
Hainan Province, China

Corresponding author:
Lin Jian-ping, M.D., Chief
physician, Department of
Joint Surgery, Hainan
Central Hospital, Haikou
570311, Hainan Province,
China

关键词:

组织构建; 骨组织工程; 骨不连; 生物标志物; 骨钙素; 人抗酒石酸酸性磷酸酶 5b; I 型胶原氨基端肽; I 型胶原羧基端肽; 骨特异性碱性磷酸酶; 海南省自然科学基金

主题词:

骨折; 骨钙素; 胶原 I 型; 组织工程

基金资助:

海南省自然科学基金资助项目(808212)

C- and N-terminal telopeptides of type I collagens, osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase used for the early diagnosis of bone nonunion

Wang Qing-hua¹, Lin Jian-ping², Shen Ning-jiang², Shi Zhan-jun³, Zhou Gang², Wu Duo-neng²
(¹Department of Surgery, ²Department of Joint Surgery, Hainan Central Hospital, Haikou 570311, Hainan Province, China; ³Department of Joint Surgery, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Detecting the serum levels of biochemical markers to assess bone fractures is simple, mini-invasive and specific. Thereafter, to predict bone nonunion by choosing an appropriate marker has become a hotspot.

OBJECTIVE: To establish an animal model of bone nonunion and explore the changing rules of the biochemical markers during the process of nonunion.

METHODS: Twenty New Zealand white rabbits aged 5–6 months were enrolled and divided into two groups. In bone defect group, a 15-mm length of bone (including the periosteum) was removed from the left mid-radius, and the medullary cavities were closed with bone wax. In bone fracture group, the mid-radius was fractured. X-ray examination was taken and blood samples were extracted preoperatively and at 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, and 12 weeks after surgery. The serum levels of osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase (BSAP) as markers of bone formation, and C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX), N-terminal telopeptide of type I collagen (NTX), and tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as markers of bone resorption, were measured using biotin double-antibody sandwich ELISA.

RESULTS AND CONCLUSION: In the bone defect group, the bone metabolism was at a high level, suggesting that the early diagnosis of bone nonunion depends on several biochemical indicators. In the bone defect group, the serum level of CTX peaked at 5 weeks, and the serum levels of osteocalcin, BSAP and NTX decreased obviously at 4 or 5 weeks, while the serum TRACP 5b concentration did not change significantly, indicating that all above markers except TRACP 5b sensitively reflect the bone turnover *in vivo*. Further studies are needed to determine whether systematic monitoring of the biochemical markers can reflect the bone turnover effectively and can be used for the early diagnosis of nonunion in the rabbit model.

Subject headings: Fractures, Bone; Osteocalcin; Collagen Type I; Tissue Engineering

Funding: the Natural Science Foundation of Hainan Province, No. 808212

Cite this article: Wang QH, Lin JP, Shen NJ, Shi ZJ, Zhou G, Wu DN. C- and N-terminal telopeptides of type I collagens, osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase used for the early diagnosis of bone nonunion. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(51):7611-7621.

0 引言 Introduction

骨不连的确诊往往需要数月的时间, 这段时间内患者需反复进行物理治疗, 常常无法生活自理, 可能还会因此失去工作, 对于医生来说, 在等待数月并最终明确骨不连的诊断后也失去了对其及时进行外科干预的机会。如果能够提前判断骨不连的发生, 就能尽早进行手术干预, 预防其他相关并发症的发生, 而且早期进行外科干预时可选择的方式将更多, 创伤会更小, 更重要的

是, 病程将会显著缩短, 医疗花费也会减少很多^[1-3]。但是, 进行早期外科干预必须建立在预测方法准确可靠的前提上, 否则不必要的手术将会造成另一次痛苦, 并形成新的并发症的可能。尽管随着医学的发展, 手术技巧不断在进步, 内固定材料和手术器械也得到了改良, 但骨不连的诊断方法并没有多少变化, 仍然主要依靠病史、体检和影像学检查, 许多骨折病例的愈合前景还是难以预测。

影像学检查就是传统的X射线,精确度欠佳^[4-10],因为这种方法容易受到主观因素、投照及冲洗条件影响,一直依靠着骨痂的矿化程度和临床医师的经验。如果骨盐含量变化小于25%,X射线就失去了分辨的价值。一般来说,不同骨折块之间的肉芽组织的作用,高度同步的成骨细胞、破骨细胞、粒细胞等之间相互影响、作用,互补的骨痂合成、新骨痂的再生等等,这些原理决定了骨折愈合过程。众所周知,传统X射线成像原理与生物化学、组织学的资料不一致,X射线无法把这一过程清晰地表现出来。寻找新的监测骨愈合过程的可行性方法,势在必行。相关研究运用振动响应、机械阻抗分析、人工神经网络及B超等技术,对骨的生物力学、整体机能以及改变已有报道,而骨折愈合标志物的资料目前在国内外报告不多见,导致骨不连的在分子水平上的诊断标准缺乏具体内涵。理论上讲,先有骨代谢异常,后有形态学变化,存在骨量变化时,生物标志物出现变化的时间应该比骨密度监测的时间变化更早。为了解决上述问题,解决骨不连的早期预测与诊断,进而在各种促进骨质成长的治疗方法包括药物等的疗效评定等方面提供理论和依据。

实验借助于骨折不愈合时骨代谢失衡、骨吸收-形成偶联学说、胶原代谢、生长因子、血管因子介导及成骨细胞等的相关功能与作用,挑选能代表骨吸收和形成的特别因子,检测它们在骨愈合过程中不同时期的浓度水平,与X射线对比,统计学分析和讨论三者的相关性,进一步挖掘出一些特别的生物因子验证是否为骨不连的标志物。作者参考相关文献,建立骨折不愈合的实验动物(兔)模型^[1-3],进行术前、术后X射线和生物标志物定期监测,分析生物标志物早期诊断骨不连的临床意义,探索实验性骨不连的早期生物标志物变化规律。通过对生物化学骨标志物的综合分析及研究,揭示其在骨新陈代谢中的作用,以此作为工具帮助临床医生检测骨折愈合,为骨折愈合的监测提供一个新的有希望的应用领域。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 于2009年4月至2010年4月在海南省人民医院动物实验中心完成。

1.3 材料

实验动物: 选取5-8月龄纯种新西兰大白兔20只,雌雄各半,体质量2.5-3.0 kg,由海南省人民医院实验

动物中心提供。按随机数字表法均分为2组,骨缺损组在左前臂桡骨中段截除1.5 cm(包括骨膜),骨断端用骨蜡封闭髓腔;骨折组只是在左前臂桡骨中段造成骨折,不行内外固定,术后兔放入笼中,单兔单笼,每日除了兔食外加新鲜蔬菜叶,室温控制在24℃,自由活动。遵照国际实验动物伦理和管理条例对实验动物进行研究。

手术器械及药物: 刀片,刀柄,蚊式钳,咬骨钳,手外科小骨刀,线剪,组织剪,无菌手术巾单,肢体固定用绳索,1号缝合线,手术台。检测仪器包括消毒游标卡尺,X射线机。实验用药品:动物用阿莫西林粉剂,3%戊巴比妥钠,氯胺酮,石灰水,络合碘。

1.4 方法

1.4.1 造模方法 将实验兔采用体积分数以20 mg/kg 3%戊巴比妥钠耳缘静脉注射,以及以50 mg/kg氯胺酮肌肉注射麻醉,麻醉成功后,将实验兔子固定于手术台,取兔子左侧前肢,备皮,剪去兔毛,手术区予络合碘消毒,铺无菌孔巾,取前肢桡骨中段之纵形皮肤切口,长2.4-3.2 cm。逐层切开后,显露桡骨中段。骨缺损组切除骨膜,以桡骨中段处弯曲度最大处为 midpoint 向桡骨近远段骨干处以锋利小骨刀截取15 mm桡骨干,以游标卡尺测量长度,长度误差控制在0.1 mm内,以小咬骨钳修整断端使其尽量平整,同时尽量使截取部位均位于桡骨中段,骨断端用骨蜡封闭髓腔。骨折组只是在前臂桡骨中段造成骨折(锋利骨刀凿断,不切除骨膜)。2组实验兔均不固定骨折部位,1号丝线分别缝合皮下和皮肤,术后2次/d络合碘消毒切口皮肤,术后12 d拆线。术后给予阿莫西林1周。

1.4.2 标本采集与处理 2组分别于术前、术后2-8, 10, 12周进行前臂的放射学检查(摄X射线片,观察桡骨缺损区愈合情况),抽取2 mL血清存于-80℃。放射学检查采用日本岛津1250型X射线机,小焦点,曝光条件为40 kV, 250 mA, 10 ms。

1.4.3 检测方法 骨形成特异标志物检测包括骨特异性碱性磷酸酶与骨钙素。骨吸收特异标志物包括I型胶原氨基端肽、抗酒石酸酸性磷酸酶5b、I型胶原羧基端肽。均采用生物素双抗体夹心ELISA法检测。检测方法:以检测I型胶原氨基端肽为例,向预先包埋了I型胶原氨基端肽单克隆抗体的酶标孔中加入I型胶原氨基端肽,温育;温育后,加入生物素标记的抗I型胶原氨基端肽抗体,再与链霉亲和素-HRP结合,形成免疫复合物,再经过温育和洗涤,去除未结合的酶,

然后加入底物A、B, 产生蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅与样品中 I 型胶原氨基端肽的浓度呈正相关。

血清检测 I 型胶原氨基端肽(同法测骨特异性碱性磷酸酶、I 型胶原羧基端肽、抗酒石酸酸性磷酸酶 5b)的过程及步骤: ①标准品的倍比稀释; ②根据待测样品数量加上标准品的数量决定所需的板条数。每个标准品和空白孔建议做复孔; ③加样: 1)空白孔: 空白对照孔不加样品, 生物素标记的抗 I 型胶原氨基端肽抗体, 链霉亲和素-HRP, 只加显色剂A&B和终止液, 其余各步骤操作相同; 2)标准品孔: 加入标准品 50 μL , 链霉素-HRP 50 μL (标准品中已事先整合好生物素抗体, 故不加); 3)待测样品孔: 加入样本 40 μL , 然后各加入抗-I 型胶原氨基端肽抗体 10 μL 、链霉亲和素-HRP 50 μL , 盖上封板膜, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min; ④配液: 将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用; ⑤洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 如此重复 5 次, 拍干; ⑥显色: 每孔先加入显色剂 A 50 μL , 再加入显色剂 B 50 μL , 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 10 min; ⑦终止: 每孔加终止液 50 μL , 终止反应(此时蓝色立转黄色); ⑧测定: 以空白孔调零, 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(A值)。测定应在加终止液后 10 min 以内进行; ⑨根据标准品的浓度及对应的 A 值计算出标准曲线的直线回归方程, 再根据样品的 A 值在回归方程上计算出对应的样品浓度。也可以使用应用软件来计算。

血清检测骨钙素的原理: 本实验采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法。用抗兔 Osteocalcin 单抗包被于酶标板上, 标准品和样品中的兔 Osteocalcin 与单抗结合, 加入生物素化的抗兔 Osteocalcin 抗体, 形成免疫复合物连接在板上, 辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与生物素结合, 加入酶底物 TMB, 出现蓝色, 加终止液硫酸, 颜色变黄, 在 450 nm 处测 A 值, 兔 Osteocalcin 浓度与 A 值成正比, 可通过绘制标准曲线求出标本中兔 Osteocalcin 浓度。

血清检测骨钙素的过程及步骤: ①实验前 20 min 从冰箱中取出试剂盒, 平衡到室温(20-25 $^{\circ}\text{C}$); ②取出所需数量的板条, 其余密封放回 4 $^{\circ}\text{C}$; ③建立标准曲线: 设标准孔 8 孔, 每孔中各加入样品稀释液 100 μL , 第一孔加标准品 100 μL , 混匀后用加样器吸出 100 μL , 移至第 2 孔。如此反复作对倍稀释至第 7 孔, 最后, 从第 7 孔

中吸出 100 μL 弃去, 使之体积均为 100 μL 。第 8 孔为空白对照; ④加样: 待测品孔中每孔各加入待测样品 100 μL ; ⑤将反应板置 37 $^{\circ}\text{C}$ 120 min; ⑥洗板: 用洗涤液将反应板充分洗涤 4-6 次, 向滤纸上印干; ⑦每孔中加入第一抗体工作液 50 μL ; ⑧将反应板充分混匀后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min; ⑨洗板: 用洗涤液将反应板充分洗涤 4-6 次, 向滤纸上印干; ⑩每孔加酶标抗体工作液 100 μL ; ⑪将反应板置 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min; ⑫洗板: 同前; ⑬每孔加入底物液 100 μL , 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 暗处反应 5-10 min; ⑭每孔加入 50 μL 终止液混匀; ⑮在 450 nm 处测 A 值(应尽快, 时间过长可能导致本底偏高)。

1.5 主要观察指标 2 组分别于术前、术后 2-8, 10, 12 周进行前臂的 X 射线片检查观察桡骨缺损区愈合情况, 并抽取血清采用生物素双抗体夹心 ELISA 法检测骨吸收特异标志物(包括 I 型胶原羧基端肽、I 型胶原氨基端肽、人抗酒石酸酸性磷酸酶 5b)及骨形成特异标志物(包括骨钙素、骨特异性碱性磷酸酶)表达变化。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用重复测量方差分析、单因素方差分析, 组间基线不一致时采用协方差分析, 得出均数估计, 进行组间效应比较, 组内(重复)效应及交互效应的比较, 以及组间多重比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 20 只手术兔切口未见感染, 无死亡及脱失, 全部进入结果分析。

2.2 影像学检查结果 骨缺损组从第 2 周 3 只有少许骨痂形成, 但 5 周后骨痂情况稳定, 术后 8 周仍所有兔均未出现愈合。骨折组术后 2 周开始骨折线模糊, 术后 6-8 周骨痂大量生长, 见图 1。

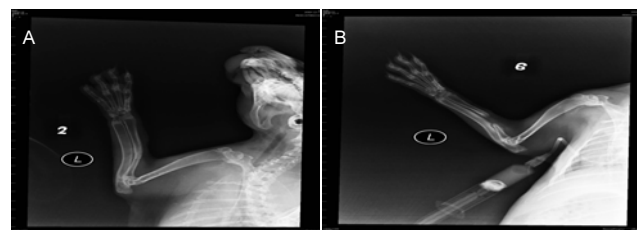


图 1 两组兔术后 8 周 X 射线片

Figure 1 X-ray images of the rabbits in the two groups at 8 weeks after surgery

图注: 图 A 为骨缺损组, 术后 8 周末见愈合; B 为骨折组, 术后 8 周骨痂大量生长。

表 1 两组兔术前术后骨特异性碱性磷酸酶活性比较

 $(\bar{x} \pm s, n=10, A)$

Table 1 Comparison of the serum level of bone-specific alkaline phosphatase of the rabbits in the two groups before and after surgery

时间	骨缺损组	骨折组	<i>F</i> / <i>t</i>	<i>P</i>
术前	97.05±12.34	102.36±22.62	1.24	0.28
术后 2 周	110.10±21.5	97.64±18.97	0.05	0.82
术后 3 周	111.50±15.50	99.33±10.68	0.58	0.46
术后 4 周	116.19±20.61	103.24±19.93	3.44	0.08
术后 5 周	104.31±13.68	105.06±17.50	9.11	0
术后 6 周	112.27±8.56	99.00±16.66	0.17	0.68
术后 7 周	113.52±12.59	103.15±10.67	7.25	0.02
术后 8 周	109.11±13.59	101.75±12.09	2.24	0.15
术后 10 周	106.88±16.77	97.21±16.68	1.71	0.21
术后 12 周	108.88±14.56	97.85±10.43	4.21	0.06
合计	108.98±15.57	100.66±15.64	16.06 ^a	0.00 ^a
<i>F</i>	0.24	1.59	0.79 ^b	
<i>P</i>	0.99	0.13	0.63 ^b	

表注: 重复测量方差分析。骨缺损组骨特异性碱性磷酸酶在术后第 5 周均值最低, 与骨折组比较差异有显著性意义。a 为主效应, b 为交互效应。

表 3 两组兔术前术后 I 型胶原氨基端肽水平比较

 $(\bar{x} \pm s, n=10, A)$

Table 3 Comparison of the serum level of N-terminal telopeptide of type I collagen of the rabbits in the two groups before and after surgery

时间	骨缺损组	骨折组	<i>F</i> / <i>t</i>	<i>P</i>
术前	42.69±13.44	30.34±11.66	11.97	0
术后 2 周	40.24±7.88	31.54±9.13	7.06	0.02
术后 3 周	39.52±7.33	40.44±6.01	0.15	0.70
术后 4 周	46.53±6.22	40.36±8.92	2.53	0.13
术后 5 周	26.37±5.54	24.98±10.38	0.06	0.81
术后 6 周	20.04±3.04	51.55±8.19	99.00	< 0.00
术后 7 周	20.83±3.35	43.85±4.70	115.48	< 0.00
术后 8 周	20.48±3.84	47.06±3.81	180.68	< 0.00
术后 10 周	20.26±2.68	49.63±5.07	216.64	< 0.00
术后 12 周	20.48±3.51	45.03±4.14	175.51	< 0.00
合计	29.74±12.23	40.47±11.16	187.51 ^a	0 ^a
<i>F</i>	0.11	0.32	29.62 ^b	
<i>P</i>	0.99	0.97	0.00 ^b	

表注: 重复测量方差分析。骨缺损组 I 型胶原氨基端肽在术后第 5 周开始均值明显下降, 术后第 6 周均值与骨折组比较差异有显著性意义。a 为主效应, b 为交互效应。

2.3 血清生物标志物测定结果 见表 1-5。

I 型胶原氨基端肽、I 型胶原羧基端肽、骨钙素组间基线不一致, 2 组间各时点的比较需要做基线调整, 采用协方差分析。2 组间的总体骨特异性碱性磷酸

表 2 两组兔术前术后 I 型胶原羧基端肽水平比较

 $(\bar{x} \pm s, n=10, A)$

Table 2 Comparison of the serum level of C-terminal telopeptide of type I collagen of the rabbits in the two groups before and after surgery

时间	骨缺损组	骨折组	<i>F</i> / <i>t</i>	<i>P</i>
术前	40.35±6.27	40.14±6.04	9.59	0.0062
术后 2 周	44.06±8.16	37.62±6.03	4.43	0.05
术后 3 周	41.68±7.28	40.15±5.40	0.30	0.59
术后 4 周	45.86±5.74	41.14±6.64	2.73	0.12
术后 5 周	53.50±11.71	39.14±6.91	10.52	0
术后 6 周	45.09±5.39	42.33±7.53	0.90	0.36
术后 7 周	45.02±3.37	42.07±5.05	2.34	0.14
术后 8 周	44.39±4.74	40.60±5.82	2.41	0.14
术后 10 周	42.25±4.01	40.27±4.98	1.02	0.33
术后 12 周	43.76±4.98	42.48±4.58	0.40	0.53
合计	44.60±7.13	40.59±5.86	27.74 ^a	0.00 ^a
<i>F</i>	0.61	0.73	2.03 ^b	
<i>P</i>	0.79	0.68	0.04 ^b	

表注: 重复测量方差分析。骨缺损组 I 型胶原羧基端肽在术后第 5 周均值最高, 与骨折组比较差异有显著性意义。a 为主效应, b 为交互效应。

表 4 两组兔术前术后抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 活性比较

 $(\bar{x} \pm s, n=10, A)$

Table 4 Comparison of the serum level of tartrate-resistant acid phosphatase 5b of the rabbits in the two groups before and after surgery

时间	骨缺损组	骨折组	<i>F</i> / <i>t</i>	<i>P</i>
术前	3.70±0.67	3.94±0.83	0.45	0.51
术后 2 周	3.86±0.71	3.52±1.05	0.44	0.51
术后 3 周	3.87±0.81	3.55±0.46	2.78	0.11
术后 4 周	4.62±1.04	3.71±0.72	1.97	0.18
术后 5 周	3.67±0.47	3.36±0.45	0.58	0.46
术后 6 周	3.62±0.56	3.69±0.62	1.76	0.20
术后 7 周	3.57±0.38	3.82±0.19	0.71	0.41
术后 8 周	3.54±0.35	3.79±0.43	0.25	0.62
术后 10 周	3.62±0.62	3.80±0.62	0.33	0.57
术后 12 周	3.72±0.59	4.04±0.49	1.31	0.27
合计	3.78±0.69	3.72±0.63	0.55 ^a	0.47 ^a
<i>F</i>	0.64	0.77	1.91 ^b	
<i>P</i>	0.76	0.65	0.05 ^b	

表注: 重复测量方差分析。骨缺损组抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 术后均值与骨折组比较均差异无显著性意义。a 为主效应, b 为交互效应。

酶、I 型胶原氨基端肽、骨钙素、I 型胶原羧基端肽水平比较差异有显著性意义(I 型胶原氨基端肽, $F=187.51, P<0.001$; 骨特异性碱性磷酸酶, $F=16.06, P=0.001$; I 型胶原羧基端肽, $F=27.74, P<0.001$;

表 5 两组兔术前术后骨钙素水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$, A)

Table 5 Comparison of the serum level of osteocalcin in the rabbits in the two groups before and after surgery

时间	骨缺损组	骨折组	<i>F</i> / <i>t</i>	<i>P</i>
术前	4.89±0.83	7.36±5.16	5.38	0.03
术后 2 周	4.72±0.14	6.94±1.65	17.72	0
术后 3 周	4.83±0.50	9.77±12.83	0.14	0.71
术后 4 周	4.68±0.34	7.90±3.92	6.49	0.02
术后 5 周	4.60±0.57	6.97±1.78	13.14	0
术后 6 周	4.68±0.16	12.49±11.86	4.02	0.06
术后 7 周	4.52±0.41	7.31±2.44	15.43	0
术后 8 周	4.58±0.33	8.60±3.31	16.80	0
术后 10 周	4.54±0.40	8.85±2.90	16.94	0
术后 12 周	4.67±0.25	8.45±2.58	23.44	0
合计	4.67 ±0.43	8.46±6.13	22.99 ^a	0 ^a
<i>F</i>	0.87	1.78	0.78 ^b	
<i>P</i>	0.56	0.083	0.51 ^b	

表注: 重复测量方差分析。骨缺损组骨钙素在术后第 4 周始均值下降, 与骨折组比较差异有显著性意义。a 为主效应, b 为交互效应。

骨钙素, $F=22.99$, $P<0.001$)。骨特异性碱性磷酸酶、骨钙素术前术后、2 组内各数值之间差异无显著性意义。骨缺损组骨钙素在术后第 4 周始均值下降, 与骨折组比较差异有显著性意义(表 5)。骨缺损组 I 型胶原羧基端肽在术后第 5 周均值最高, 与骨折组比较差异有显著性意义(表 2)。骨缺损组术后骨特异性碱性磷酸酶活性升高, 第 4 周达到高峰, 第 5 周时出现下降, 第 6 周以后数值基本稳定。骨缺损组骨特异性碱性磷酸酶在术后第五周均值最低, 与骨折组比较差异有显著性意义(表 1); 骨缺损组 I 型胶原氨基端肽在术后 5 周开始出现明显下降, 术后 5 周与术前、术后各个时间比较差异均有显著性意义, 术后 7, 8, 10, 12 周均与术后 3, 4, 5 周比较差异有显著性意义, 术后 6 周以后 I 型胶原氨基端肽水平基本稳定, 与骨折组术后 6-12 周对应时间点比较差异有显著性意义(表 3); 骨缺损组术后抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 活性升高, 在第 4 周出现明显的峰值, 然后下降, 基本稳定(表 4), 术前术后、组间、组内各数值之间差异无显著性意义。

3 讨论 Discussion

骨吸收、骨形成和静止 3 个阶段构成了骨的重建过程, 人体骨骼是动态变化的组织, 大约每年有 10% 的骨骼被更新。研究骨不连的方法包括骨代谢生化指标的测定、骨矿盐密度与骨形态计量学等。生化指标已经成为人们进一步探索骨不连的得力途径, 具有无

创性、可重复检测等特点。骨代谢过程可以通过生化标志物反映出来, 间接显示破骨细胞与成骨细胞的活性。骨代谢的过程即是破骨细胞不断清除旧骨, 成骨细胞形成类骨质并进行矿化的过程, 这两个过程在空间和时间上紧密耦联, 并发生在同一重建单位中^[4-7]。整个骨吸收-骨重建过程受成骨细胞调控。骨量的多少取决于同一骨重建单位中骨吸收和骨形成的平衡。当这一平衡被破坏, 骨吸收大于骨形成时, 就导致了骨不连的发生。

对血液中骨代谢标志物的浓度进行检测以对骨折愈合情况进行评估具有使用简单、创伤小、变异小的特点, 如何找到一种合适的标志物以预测骨不连的发生是当前该领域研究的热点。骨特异性碱性磷酸酶和骨钙素等是当前研究得相对较多的集中骨代谢标志物^[11-12]。

骨特异性碱性磷酸酶是骨生长过程中持续释放时间最长的细胞因子, 并且还具有组织特异性强、时间变异性小的特点^[13-15]。骨特异性碱性磷酸酶由成骨细胞产生, 是碱性磷酸酶的亚型, 存在于成骨细胞膜结合物。骨特异性碱性磷酸酶是反映骨形成和成骨细胞活性的敏感和特异指标, 能排除肝、肾、肠等疾病影响, 是成骨细胞的胞外酶, 成骨细胞活性增强, 则骨特异性碱性磷酸酶分泌增加。Southwood 等^[16]报道兔股骨缺损实验中, 术后 0-4 周血清骨钙素和骨特异性碱性磷酸酶浓度下降, 在第 8 周达到高峰, 然后下降。血清 DPYR 浓度在 4 周达到高峰, 然后减少。由此得出结论: 多个血清生化指标的检测有益于骨折愈合的早期诊断的临床评估。骨特异性碱性磷酸酶在骨折愈合过程浓度会升高, 而且会因为不同的治疗方法和骨折类型而有不同水平的升高。Ly 等^[17-19]在用保守疗法治疗长骨骨折的 49 例患者中, 监测了骨特异性碱性磷酸酶活性变化, 结果发现在伤后第 15 周达到峰值, 在六至七个月骨特异性碱性磷酸酶回落到伤前的浓度水平。有研究对 30 例胫骨干骨折患者骨特异性碱性磷酸酶浓度做了比较分析, 无论保守或手术疗法, 与 Ly 的结果不同的是, 骨特异性碱性磷酸酶在 1 年内没有回到基线水平。Fouk 等^[20-22]对 20 例胫骨干骨折的患者, 连续 20 周的观察, 部分患者直到 20 周才出现骨特异性碱性磷酸酶的峰值。Webb 等^[23-25]在一组病例中, 对于创伤性患者胫骨干骨折、股骨近端骨折、股骨颈骨折进行内固定治疗, 连续监测超过 20 周的骨特异性碱性磷酸酶水平。估计是股骨骨折患者平均年龄偏大, 老年人骨更新下降的原因, 股骨骨折患者骨特异性碱性磷酸酶水平最低, 胫骨干骨折患者

骨特异性碱性磷酸酶基线水平较高。在所有病例中, 他们观察到在术后 3-6 周出现骨特异性碱性磷酸酶的峰值。Patil^[26]、Yu-yahiro 等^[27]分别对 14 例股骨和胫骨骨折、205 例髌部骨折的妇女手术治疗后的患者进行连续观察, 骨特异性碱性磷酸酶峰值发现在术后 4-12 周出现。本实验研究中, 骨缺损组骨特异性碱性磷酸酶术后升高, 第 4 周达到高峰, 第 5 周时出现下降, 第 6 周以后数值基本稳定。2 组的骨特异性碱性磷酸酶活性差异有显著性意义, 但 2 组内差异未见显著性意义。本实验的数据和 Southwood 等的结果有一定的出入, 但和 Patil^[26]、Yu-yahiro 等^[27]结果有近似之处, 估计和实验设计、试剂盒的敏感性等有一定的关系。骨缺损组骨特异性碱性磷酸酶活性在术后第 5 周均值最低, 与骨折组比较差异有显著性意义。动态分析骨特异性碱性磷酸酶的变化, 对兔实验性骨折愈合过程的监测是有帮助的。

骨钙素是骨基质中胶原以外含量最高的蛋白质, 是一种由 49 个氨基酸组成的无胶原基质蛋白, 在骨生长过程中其血浆浓度变化一般来说不明显^[28-29]。在成人, 几乎血液中所有的骨钙素来自成骨细胞。骨钙素的血清浓度与骨形成的组织学定量参数相关, 骨钙素在促进基质的矿化和骨重塑过程中起调节作用, 被认为是成骨细胞活性的特异性指标。骨钙素最早从动物及人骨中提取的, 由非增殖期成骨细胞合成和分泌的, 有 3 个谷氨酸羧基化, 血液中存在小部分骨钙素, 成熟的骨钙素主要沉积在骨组织间质细胞外和牙质中。众多体内外研究证实, 骨钙素不仅参与参与骨吸收的调节, 更重要的是参与基质的矿化过程及成骨细胞分化。20 世纪 80 年代末 Eastell 等^[30]提出血清骨钙素是目前骨转换研究领域中的一个敏感及重要的生物因子, 可作为评估骨形成和骨转换率的特异和灵敏性指标。Delmas^[31]的研究证明, 当骨吸收和骨形成解耦联时, 骨钙素作为特异性指标可直接反映骨形成的速率, 反映骨形成具体情况; 当骨吸收和骨形成耦联时, 骨钙素可以直接反映骨转换情况。国内学者研究发现骨钙素与骨密度直线相关, 骨钙素升高, 表明骨量增加, 骨生成增多, 骨密度相应性升高。因此骨钙素在一定程度上可预测骨密度的量, 对骨不连可做初步预测。大多数的研究都证实骨钙素水平增高经常是在骨折后的一段时间里。有学者在基线相同情况下, 研究一部分患者使用相同的骨钙素测定方法, 发现骨钙素水平和 Delmas 等^[31-32]的论文存在相似的骨钙素延迟增加

情况, 资料显示, 33 例正常骨折愈合和 11 例延迟愈合骨钙素的检测材料, 证实了骨钙素水平增高明显延迟发生在骨折愈合障碍的病例里。本研究中, 相对于骨折组而言, 骨缺损组骨钙素在术后第 4 周始均值下降, 与骨折组比较差异有显著性意义, 骨钙素在兔实验性骨不连的诊断上应该是一个敏感性的指标。

随着破骨细胞和中性粒细胞的浸润以及肉芽组织的形成, 骨折处的表面被侵蚀、血肿被去除, 骨折后 2 周内骨降解是最明显的, 骨吸收标志物会出现显著性改变^[33-35]。抗酒石酸酸性磷酸酶是骨吸收的一个重要指标, 有报道抗酒石酸酸性磷酸酶在前臂远端骨折未升高, 但在踝关节骨折后抗酒石酸酸性磷酸酶反而升高了。抗酒石酸酸性磷酸酶在骨吸收过程中, 该分子进入血循环, 可以用亚型特异性免疫学方法进行检测。相比于其他亚型酸性磷酸酶, 还不能被酒石酸抑制。抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 主要由破骨细胞产生和释放, 是 6 种酸性磷酸酶同工酶之一, 即第 5 型。2 种几乎等量的 5 型抗酒石酸酸性磷酸酶, 即 5a 和 5b, 存在正常人血清里。纯化的人破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶是 5b, 5a 可以在唾液酸酶作用下转变成 5b。血清中抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 的浓度水平, 可以直接提示体内破骨细胞活性和骨降解状态。抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 具有降低骨折的风险预测、早期监测骨质变化等作用, 是第 2 代反映骨吸收的骨特异性生物因子和破骨细胞衍生物, 由于其结果不受昼夜变化、饮食、肝、肾疾病的影响, 特异性极高^[36-38]。

胶原蛋白尤其是 I 型胶原蛋白是骨细胞外基质中含量最为丰富的有机成分, 占到了 90% 以上^[39-40], 虽然 I 型胶原还存在于肝脏、皮肤和大肠等组织内, 然而, 其他组织内的 I 型胶原含量相对于骨骼少之又少, 因此体内 I 型胶原的代谢情况能够很好地反映出骨折愈合过程中骨质的生长情况。I 型胶原由 2 个非螺旋肽:

I 型胶原羧基端肽 I 型胶原氨基端肽组成, I 型胶原的三维螺旋分子链由 DPYR 和 PYR 连接起来。I 型胶原氨基端肽和 I 型胶原羧基端肽被认为是高度特异性骨生物因子。因为破骨细胞无法降解其他组织中的 I 型胶原, 骨和其他组织的降解碎片是不同的。I 型胶原在破骨细胞作用的骨降解期间被劈开, 释放出 I 型胶原羧基端肽和 I 型胶原氨基端肽。大部分对 I 型胶原氨基端肽及 I 型胶原羧基端肽的研究是预测骨质疏松骨折的风险上, 在骨折愈合过程中的报道很少见^[41-44], I 型胶原氨基端肽与 I 型胶原羧基端肽的

检测结果的出现,基本代替了 DPYR 与 PYR 的检测。Borys 等^[43]报告了在股骨干、股骨内髁骨折后第 4 天, I 型胶原羧基端肽浓度升高, 2 周后达到峰值。Ingle 等^[44]发现在骨折愈合过程早期 I 型胶原氨基端肽出现升高, 在 20 个前臂骨折的患者中各测了 1 次 I 型胶原氨基端肽就出现这样的结果。理论上理解, 骨降解标志物对骨折愈合的监测在临床日常工作中应该很有意义。Moghaddam 等^[45]从 248 例长骨骨折外科治疗样本病例中, 对比 15 例萎缩性骨不连患者与 15 例正常骨愈合患者, 分别给予术后 1, 2, 4, 8, 12, 52 周生化标志物监测, 发现第 1 周 I 型胶原羧基端肽绝对值在延迟骨折愈合组明显减少; 在 4 周和 8 周, 人抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 相对值明显减少, 骨特异性碱性磷酸酶和 I 型前胶原氨基端肽水平在 1 周内升高然后下降, 但在同时间 2 组间绝对值和相对值比较, 差异未见显著性意义。由此得出结论, 系统性观察人抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 和 I 型胶原羧基端肽的改变, 可以监测骨愈合的进程。本实验研究中, 骨缺损组人抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 术后升高, 在第 4 周出现明显的峰值, 然后下降, 基本稳定。骨缺损组抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 在术后均值与骨折组比较差异无显著性意义。骨缺损组 I 型胶原羧基端肽第 5 周时出现高值, 与骨折组比较差异有显著性意义。尽管这些结果和 Moghaddam 的描述有一定的出入, 但作者得出的结论和 Moghaddam 是一致的: 同时进行系统的监测人抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 和 I 型胶原羧基端肽的变化, 有可能可以尽早发现骨折愈合成功与否。I 型胶原羧基端肽应该是监测兔实验性骨不连的敏感指标之一。

I 型胶原氨基端肽是 I 型胶原交联总的 N 端交联物、末端肽, 是通过脱氧吡啶啉(HP)及吡啶啉(LP)分别连接的 2 条链末端肽、低分子肽。脱氧吡啶啉是成熟胶原的主要成份, 存在于骨与软骨中, 吡啶啉占成熟胶原的 21%, 主要存在于骨中。在骨吸收过程中破骨细胞的作用下, 脱氧吡啶啉和吡啶啉从骨基质中释放出来, 以肽结合方式或游离氨基酸形式, 即 I 型胶原氨基端肽, 是骨降解后尿中出现的一种稳定最终产物, 从尿中排出。20 世纪 90 年代, Hanson 等^[46]用 ELISA 法测定 I 型胶原氨基端肽, 在体外将破骨细胞培养在骨片上时, 发现培养液中有免疫活性的 I 型胶原氨基端肽。Rosen 等^[47]研究发现, I 型胶原氨基端肽和骨密度呈负相关, 基础 I 型胶原氨基端肽值越高, 其骨密度下降越快。Garcia-Perez 等^[48]研究发现, I 型胶原氨

基端肽与骨组织特异性很强, 与骨吸收密切相关。本实验中, 骨缺损组 I 型胶原氨基端肽在第 5 周出现明显的降低, 术后 5 周与术前术后各个时间相比差异均有显著性意义, 术后 7, 8, 10, 12 周均与术后 3, 4, 5 周差异有显著性意义; 从第 6 周开始出现平稳的 I 型胶原氨基端肽水平, 与骨折组差异有显著性意义。本研究表明 I 型胶原氨基端肽的浓度变化与骨折愈合过程密切相关。骨折或者骨缺损发生后血浆 I 型胶原氨基端肽浓度即明显升高并持续在这一水平达 4 周左右, 之后骨折组 I 型胶原氨基端肽浓度在一过性降低后即又逐渐升高, 而骨缺损组 I 型胶原氨基端肽浓度在降低后一直持续在较低水平。作者认为骨折或者骨缺损后早期的血浆 I 型胶原氨基端肽浓度升高与 I 型胶原大量生成和分解有关——Kon 等^[49]的研究表明骨折后早期在骨折局部生成了大量的 I 型胶原而不是传统理论上的 III 型胶原, 另外, 骨折断端间骨质吸收的影响也不能排除。骨折后第 2 周开始编织骨将逐渐取代软骨骨痂, 直至骨折后第三至四周这些软骨骨痂将几乎完全被编织骨所取代。而当编织骨等原始骨痂完全形成后 I 型胶原的生成减少, 降解破坏的也少, 这一时间大约是骨折后第 5 周, 这时 I 型胶原氨基端肽的浓度降低反映了 I 型胶原代谢率的降低。术后第 5 周以后骨折组表现为 I 型胶原氨基端肽的逐步升高, 这应该是由骨痂改造塑形过程中大量的编织骨被破坏所引起——骨痂按照 Wolff 定律进行改造塑形, 在应力轴线上成骨, 而应力轴线以外破骨, 大量多余的骨痂被清除和吸收, 这又一次使 I 型胶原氨基端肽浓度升高。而骨缺损组的骨折断端则因无法形成骨性连接而进行骨的塑形, 因此 I 型胶原氨基端肽浓度在骨缺损组术后第 5 周以后一直持续低平。作者推测, 当骨塑形完全结束后将不会再有旺盛的成骨和破骨活动, 骨折组 I 型胶原氨基端肽的血浆浓度仍将降低直至和骨缺损组的浓度相当。

分析前后骨代谢指标的变化发现, 骨缺损组抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 在术后均值与骨折组比较差异无显著性意义。骨缺损组骨钙素在术后第 4 周始均值下降, 与骨折组比较差异有显著性意义。骨缺损组骨特异性碱性磷酸酶在术后第 5 周均值最低, 与骨折组比较差异有显著性意义。骨缺损组 I 型胶原羧基端肽在术后第 5 周均值最高, 与骨折组比较差异有显著性意义。骨缺损组 I 型胶原氨基端肽在术后第 5 周开始均值明显下降, 术后 5 周与术前术后各个时间均差异有显著性意义, 术

后 7, 8, 10, 12 周均与术后 3, 4, 5 周差异有显著性意义, 术后第 6 周及以后各个时间均值与骨折组比较差异有显著性意义。这些结果说明了骨缺损组骨代谢十分活跃, 各个血清生化指标有不同的变化曲线, 同时给与它们跟踪和检测, 将有利于骨不连的早期诊断与临床评估。抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 术前术后、2 组间比较意义不大, 骨缺损组中 I 型胶原羧基端肽在术后第 5 周均值最高, 骨钙素、骨特异性碱性磷酸酶、I 型胶原氨基端肽在术后 4 或 5 周均值明显下降, 是否提示了 I 型胶原羧基端肽、骨钙素、骨特异性碱性磷酸酶、I 型胶原氨基端肽能敏感地反映体内骨吸收和骨形成偶联被激活, 各个指标能快速随骨吸收和形成的迅速发展而改变。在严格的实验室条件控制下, 排除其他干扰因素, I 型胶原羧基端肽、骨钙素、骨特异性碱性磷酸酶、I 型胶原氨基端肽是否都可以作为反映骨转换的特异性、敏感性较强的指标, 是否可以运用于早期诊断兔的骨不连, 有待于进一步大数据的规范化分析。

骨代谢标志物运用于监测骨折愈合已经有相关报道, 部分监测指标已经有高度的理论可行性, 但由于现有报道的结果不充分且不令人满意, 所以近 10 年来却没有一项生化标志物被运用于临床工作中。

困惑在哪, 首先, 这些研究必须获得伦理的同意。不同骨折分型、骨折部位不同, 治疗方式不尽相同, 检测到的骨生化标志物也是千变万化的。对同一指标的对比研究, 不同的年龄组, 选择尿或血样的浓度都有差别。有些指标, 可以使用血清监测或者也可以尿样检测, 方法不同限定了不同研究之间的可比性。现有的骨生化标志物种类繁多, 已经有不同组合相关标志物的研究报告, 很多已经报告的数据库里, 每个标志物的有效数据, 相对有限。另外, 骨折愈合障碍、骨不连患者一般来说占骨折患者总数 5%, 一般研究中受试者数量最多不会超过 30 例, 所以各个临床相关研究只能完成少部分有关的生物化学骨标志物的动力学差别。血样的采血时间也是影响对比结果分析的另一个重要问题, 应该早晨空腹采样。标准化的血样采集时间和采集方法有助于为骨不连系列生化标志物监测工作提供有效和合理的建议。骨形成标志物最好在创伤后 2-12 周连续采集血样。在这段期间, 很有必要多次反复测量。实验设计对于整个研究结果很重要, 研究者对结果的分析也很关键。不同的统计方法、正确的思维、对结果的判断, 对于整个研究有非同寻常的意义。

对于生化标志物的选择, 作者主张选择目前大家最认可的生物因子。骨特异性碱性磷酸酶和骨钙素在骨形成标志物中可以优先选择进行研究, 而 I 型胶原氨基端肽和 I 型胶原羧基端肽可以作为骨降解标志物则来重点监测。第二, 疑似骨不连患者, 追踪观察应持续至少 6 个月的时间。骨折当日、1 周后、以后每 2 周采集血样 1 次, 直到伤后第 12 周、之后每月采集血样 1 次, 直至创伤后第 6 个月, 血样采集后应立即离心并冷冻保存到检测当日。第三, 研究重点应该选择骨折不愈合的最好发部位, 比如胫骨中下 1/3 处。第四, 扩大研究范围, 应获得足够的受试者, 多中心合作。第五, 数据库建立清晰, 各个数据分析应该包括每个个体间的差别。

结论: 研究骨转换和骨代谢的较好工具是骨生物化学标志物。骨不连的生化标志物检测研究是一个很有深度的基础和临床相结合的应用领域, 更多更深的骨折愈合分子及基因领域需要进一步探讨。现有的统计数据也不是很令人满意。然而, 骨特异性碱性磷酸酶、I 型胶原氨基端肽、I 型胶原羧基端肽和骨钙素的研究结果有益于预测骨折愈合的转归, 需要研究的标准化以及大量的实验和临床数据来证实这一点。

作者贡献: 王清华为第一作者, 林坚平、沈宁江、史占军指导, 周钢、吴多能进行生化试剂检测, 林坚平为通讯作者及课题负责人。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容无相关利益冲突。

伦理问题: 实验相关方案均提交海南省人民医院医学伦理部门审核, 并经批准, 符合相关伦理学要求。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度的减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Sato Y, Kaji M, Higuchi F, et al. Changes in bone and calcium metabolism following hip fracture in elderly patients. *Osteoporos Int.* 2001;12:445-449.
- [2] Lotz J, Gaertner T, Hahn M, et al. Collagen type I metabolism after bone surgery. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1999;119:212-216.
- [3] Court-Brown CM, McQueen MM. Nonunions of the proximal humerus: their prevalence and functional outcome. *J Trauma.* 2008; 64(6):1517-1521.
- [4] Gothlin G, Ericsson JL. Fine structural localization of alkaline phosphatase in the fracture callus of the rat. *Histochemie.* 1973;36(3):225-236.
- [5] Felix R, Herrmann W, Fleisch H. Stimulation of precipitation of calcium phosphate by matrix vesicles. *J Biochem.* 1978;170(3):681-691.
- [6] Anderson HC, Stechschulte DJ Jr, Collins DE, et al. Matrix vesicle biogenesis in vitro by rachitic and normal rat chondrocytes. *Am J Pathol.* 1990;136(2):391-398.
- [7] Parker MJ, Raghavan R, Gurusamy K. Incidence of fracture-healing complications after femoral neck fractures. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;458:175-179.
- [8] Giannoudis PV, MacDonald DA, Matthews SJ, et al. Nonunion of the femoral diaphysis. The influence of reaming and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Bone Joint Surg Br.* 2000;82(5):655-658.
- [9] Society COT. Nonunion following intramedullary nailing of the femur with and without reaming. Results of a multicenter randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A(11):2093-2096.
- [10] Phieffer LS, Goulet JA. Delayed unions of the tibia. *Instr Course Lect.* 2006;55:389-401.
- [11] Oni OO, Mahabir JP, Iqbal SJ, et al. Serum osteocalcin and total alkaline phosphatase levels as prognostic indicators in tibial shaft fractures. *Injury.* 1989;20(1):37-38. 148.
- [12] Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev.* 2005; 26(4): 97-122.
- [13] Pedersen BJ, Schlemmer A, Hassager C, et al. Changes in the carboxyl-terminal propeptide of type I procollagen and other markers of bone formation upon five days of bed rest. *Bone.* 1995;17(1):91-95.
- [14] Lian J, Stewart C, Puchacz E, et al. Structure of the rat osteocalcin gene and regulation of vitamin D-dependent expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(4):1143-1147.
- [15] Noite PA, Vander Krans A, Patka P, et al. Low-intensity pulsed ultrasound device for the noninvasive treatment of nonunions. *J Trauma.* 2001;51(4): 693-702
- [16] Southwood LL, Frisbie DD, Kawcak CE, et al. Evaluation of serum biochemical markers of bone metabolism for early diagnosis of nonunion and infected nonunion fractures in rabbits. *Am J Vet Res.* 2003 ;64(6):727-735.
- [17] Ly TV, Swiontkowski MF. Treatment of femoral neck fractures in young adults. *J Bone Joint Surg Am.* 2008; 90(10):2254-2266.
- [18] Yokoyama K, Itoman M, Uchino M, et al. Immediate versus delayed intramedullary nailing for open fractures of the tibial shaft: A multivariate analysis of factors affecting deep infection and fracture healing. *Indian J Orthop.* 2008;42(4):410-419.
- [19] Loder RT. The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures. *Clin Orthop Relat Res.* 1988;(232):210-216.
- [20] Foulk DA, Szabo RM. Diaphyseal humerus fractures: natural history and occurrence of nonunion. *Orthopedics.* 1995; 18(4):333-335.
- [21] Lindsey RW, Blair SR. Closed tibial-shaft fractures: which ones benefit from surgical treatment? *J Am Acad Orthop Surg.* 1996;4(1):35-43.
- [22] Herrmann M, Klitscher D, Georg T, et al. Different kinetics of bone markers in normal and delayed fracture healing of long bones. *Clin Chem.* 2002;48: 2263-2266.
- [23] Webb LX, Winquist RA, Hansen ST. Intramedullary nailing and reaming for delayed union or nonunion of the femoral shaft. A report of 105 consecutive cases. *Clin Orthop Relat Res.* 1986;(212):133-141.
- [24] Wu CC. The effect of dynamization on slowing the healing of femur shaft fractures after interlocking nailing. *J Trauma.* 1997;43(2):263-267.
- [25] Weresh MJ, Hakanson R, Stover MD, et al. Failure of exchange reamed intramedullary nails for ununited femoral shaft fractures. *J Orthop Trauma.* 2000;14(5): 335-338.
- [26] Patil S, Montgomery R. Management of complex tibial and femoral nonunion using the Ilizarov technique, and its cost implications. *J Bone Joint Surg Br.* 2006;88(7): 928-932.
- [27] Yu-yahiro JA, Michael RH, Dubin NH, et al. Serum and urine markers of bone metabolism during the year after hip fracture. *J Am Geriatr Soc.* 2001;49: 877-883.
- [28] Kyro A, Usenius JP, Aarnio M, et al. Are smokers a risk group for delayed healing of tibial shaft fractures? *Ann Chir Gynaecol.* 1993;82(4):254-262.
- [29] Adams CI, Keating JF, Court-Brown CM. Cigarette smoking and open tibial fractures. *Injury.* 2001;32(1): 61-65.

- [30] Eastell R, Yergey AL, Vieira NE, et al. Interrelationship among vitamin D metabolism, true calcium absorption, parathyroid function, and age in women: evidence of an age-related intestinal resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D action. *J Bone Miner Res.* 1991;6(2):125-132.
- [31] Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic bone disease. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1990; 19(1):1-18.
- [32] Dahabreh Z, Calori GM, Kanakaris NK, et al. A cost analysis of treatment of tibial fracture nonunion by bone grafting or bone morphogenetic protein-7. *Int Orthop.* 2009;33(5):1407-1414.
- [33] Haining SA, Atkins RM, Guiland-Cumming DF, et al. Vitamin D metabolites in patients with established non-union of fracture. *Bone Miner.* 1986;1(3): 205-209.
- [34] Kaplan FS, Hayes WC, Keaveny TM, et al. Form and function of bone. In: Simon, SS. editor. *Orthopaedic basic science.* Rosemont (IL): American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994:127-184.
- [35] Linkhart SG, Linkhart TA, Taylor AK, et al. Synthetic peptide-based immunoassay for amino-terminal propeptide of type I procollagen: application for evaluation of bone formation. *Clin Chem.* 1993;39(11 Pt 1):2254-2258.
- [36] Gineyts E, Cloos PA, Borel O, et al. Racemization and isomerization of type I collagen C-telopeptides in human bone and soft tissues: assessment of tissue turnover. *Biochem J.* 2000;345(Pt 3):481-485.
- [37] Blokhuis TJ, De Bruine JH, Bramer JA, et al. The reliability of plain radiography in experimental fracture healing. *Skeletal Radiol.* 2001;30:151-156.
- [38] Caruso G, Lagalla R, Derchi L, et al. Monitoring of fracture calluses with color Dopplers on ography. *H Clin Ultrasound.* 2000;28:20-27.
- [39] Seibel MJ. Molecular markers of bone turnover: Biochemical technical and analytical aspects. *Osteoporos Int.* 2000;11(suppl 6):18-29.
- [40] Szulc P, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover in men. *Calcif Tissue Int.* 2001;69: 229-234.
- [41] Laurer HL, Hagenbourger O, Quast S, et al. Sequential changes and pattern of bone specific alkaline phosphatase after trauma. *Eur J Trauma.* 2000;1: 33-38.
- [42] Kurdy NM. Serology of abnormal fracture healing: The role of PINP, PICP, and BsALP. *J Orthop Trauma.* 2000;14:48-53.
- [43] Borys J, Grabowska SZ, Antonowicz B, et al. The concentration of C-terminal propeptide of type I procollagen in blood serum in the course of mandibular fracture healing (preliminary report). *Tocz Akad Med Bial Ymst.* 2001;46:251-262.
- [44] Ingle BM, Hay SM, Bottjer HM, et al. Changes in bone mass and bone turnover following ankle fracture. *Osteoporos Int.* 1999;10:408-415.
- [45] Moghaddam A, Müller U, Roth HJ, et al. TRACP 5b and CTX as osteological markers of delayed fracture healing. *Injury.* 2011;42(8):758-764.
- [46] Hanson DA, Weis MA, Bollen AM, et al. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J Bone Miner Res.* 1992; 7(11):1251-1258.
- [47] Rosen HN, Moses AC, Garber J, et al. Utility of biochemical markers of bone turnover in the follow-up of patients treatment with bisphosphonates. *Calcif Tissue Int.* 1998;63:363-368.
- [48] Garcia-Perez MA, Moreno-Mercer J, Tarin JJ, et al. Similar efficacy of low and standard doses of transdermal estradiol in controlling bone turnover in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol.* 2006; 22(4):179-184.
- [49] Kon T, Cho TJ, Aizawa T, et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2001;16(6):1004-1014.