

创伤性脑损伤合并骨折中加速骨折愈合过程中相关因子的表达

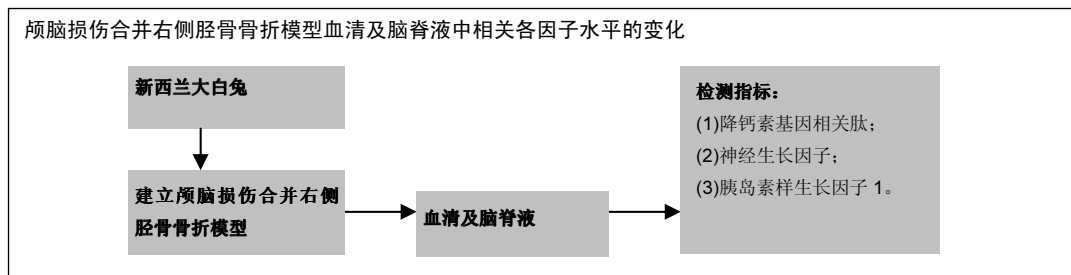
马乐园, 赵岩, 乔万庆, 朱锋(新疆医科大学第一附属医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054)

引用本文: 马乐园, 赵岩, 乔万庆, 朱锋. 创伤性脑损伤合并骨折中加速骨折愈合过程中相关因子的表达[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(32):5115-5121.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.32.006

ORCID: 0000-0003-1091-0705(马乐园)

文章快速阅读:



马乐园, 男, 1989年生, 山东省济南市人, 汉族, 2017年新疆医科大学毕业, 硕士, 医师。

通讯作者: 赵岩, 博士, 主任医师。新疆医科大学第一附属医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2017)32-05115-07

稿件接受: 2017-10-03

文题释义:

降钙素: 是甲状腺的滤泡旁细胞(明亮细胞或C细胞)产生和分泌, 主要生理功能是降低血钙、血磷的水平。
胰岛素样生长因子: 是一类多功能细胞增殖调控因子, 在细胞的分化、增殖、个体的生长发育中具有重要的促进作用。

摘要

背景: 颅脑损伤能促进骨折愈合的现象, 近年逐渐成为热点话题, 但其发生机制还不明确。

目的: 建立颅脑损伤合并右侧胫骨骨折兔模型, 观察血清及脑脊液降钙素基因相关肽及神经生长因子及胰岛素样生长因子1在骨折愈合中的变化趋势。

方法: 将新西兰大白兔随机分为4组, 对照组、单纯颅脑损伤组、单纯骨折组及颅脑损伤合并骨折组, 后3组分别建立颅脑损伤模型、右侧胫骨骨折模型及颅脑损伤合并右侧胫骨骨折模型, 对照组为正常新西兰大白兔。建模后检测各组不同时间脑脊液、血清中的3种因子表达水平。对于骨折组及颅脑损伤合并骨折组分别建模后1, 4, 8周麻醉处死, 取骨全长拍X射线片, 测量骨痂体积并进行病理分析。

结果与结论: 颅脑损伤合并骨折组骨折愈合速度比单纯骨折组快; 建模后4周颅脑损伤合并骨折组骨痂体积、骨小梁宽度、骨小梁面积比、新生血管数量明显高于单纯骨折组($P < 0.05$); 颅脑损伤合并骨折组血清及脑脊液中3种因子较单纯骨折组明显升高($P < 0.05$), 且3种因子于脑脊液中达峰时间较血清明显提前。在颅脑损伤合并骨折组中3种因子相比, 其中降钙素基因相关肽升高时间较神经生长因子、胰岛素样生长因子1早。结果证实, 在颅脑损伤后促进骨折愈合过程中, 降钙素基因相关肽、神经生长因子及胰岛素样生长因子1是促进骨折愈合的相关因素, 其中降钙素基因相关肽促进骨折愈合的速度最快。

关键词:

组织构建; 骨组织工程; 脑损伤; 骨折愈合; 降钙素基因相关肽; 神经生长因子; 胰岛素样生长因子1; 加速; 骨痂体积; 血清; 脑脊液; 病理切片; 异位骨化; 新生血管; 新疆维吾尔自治区自然科学基金

主题词:

组织工程; 神经生长因子; 脑损伤; 骨折

基金资助:

新疆维吾尔自治区自然科学基金(2014211C045)

Related factors accelerate fracture healing in traumatic brain injury combined with fracture

Ma Le-yuan, Zhao Yan, Qiao Wan-qing, Zhu Feng (First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: Brain injury can promote fracture healing is becoming an issue of concern, but the underlying mechanism remains unknown.

OBJECTIVE: To establish a model of cerebral injury combined with right tibial fracture, and to investigate the cerebrospinal fluid and serum levels of calcitonin gene-related peptide, nerve growth factor and insulin-like growth factor-1.

METHODS: New Zealand white rabbits were randomly divided into four groups: group A: blank control group;

Ma Le-yuan, Master, Physician, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Zhao Yan, M.D., Chief physician, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054,

group B: simple brain injury group; group C: simple tibial fracture group; group D: tibial fracture combined with brain injury. The cerebrospinal fluid and serum levels of calcitonin gene-related peptide, nerve growth factor and insulin-like growth factor-1 were detected at different time points. The rabbits in the groups C and D were sacrificed at 1, 4 and 8 weeks after modeling to remove the whole tibia, and scanned by X-ray. The callus volume was calculated, and the pathological changes were analyzed.

RESULTS AND CONCLUSION: The fracture healing was faster in the group D than the group C. The callus volume, trabecular width, trabecular area ratio, and the number of newly born vessels in the group D were significantly higher than those in the group C at 4 weeks after modeling ($P < 0.05$). The cerebrospinal fluid and serum levels of calcitonin gene-related peptide, nerve growth factor and insulin-like growth factor-1 in the group D were significantly higher than those in the group C ($P < 0.05$), and the cerebrospinal fluid levels reached the maximum values earlier than did the serum levels. Furthermore, in the group D, the calcitonin gene-related peptide level was increased earlier than the other two factors. To conclude, calcitonin gene-related peptide, nerve growth factor and insulin-like growth factor-1 are essential factors involved in promoting fracture healing after traumatic brain injury, and moreover calcitonin gene-related peptide shows a stronger ability than the other factors.

Subject Headings: Tissue Engineering; Nerve Growth Factor; Brain Injuries; Fractures, Bone

Funding: the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2014211C045

Cite this article: Ma LY, Zhao Y, Qiao WQ, Zhu F. Related factors accelerate fracture healing in traumatic brain injury combined with fracture. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(32):5115-5121.

0 引言 Introduction

脑损伤合并骨折的患者骨痂超常生长,甚至肌肉组织中会呈现出异位骨化的现象^[1-3]。有研究表明伴有脑损伤的骨折患者其骨折局部骨痂体积更大^[4],并且在血清和脑脊液中可能存在某种蛋白质调节骨祖细胞的亲和性,促进骨折愈合。近年来诸多学者研究表明神经营养因子、降钙素基因相关肽及胰岛素样生长因子1是加速颅脑损伤患者骨折修复的关键所在,但研究者多以其中一种因子作为研究对象,范围局限。

实验建立脑创伤合并骨折模型,进一步揭露3种因子在脑创伤后的变化趋势以及3者之间的相互关系,能够为后期对骨折延期愈合、骨不连等治疗上选择性应用此3种因子提供理论基础和依据。

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2016年3月至12月于新疆医科大学第一附属医院动物实验室及细胞培养室完成。

1.3 材料 新西兰大白兔48只,雌雄不限,体质量2.5-3.0 kg,由新疆医科大学第一附属医院动物实验中心提供,实验动物生产与使用许可证号:SCXK(新)2011-0004。

1.4 实验方法

1.4.1 分组及干预 将48只兔随机分为4组,空白对照组不做任何处理,单纯颅脑损伤组建立颅脑损伤模型,单纯骨折组建立右侧胫骨骨折模型,脑创伤合并骨折组先建立颅脑损伤模型再建立右侧胫骨骨折模型,每组12只。

1.4.2 动物模型的构建

颅脑损伤模型制作: 参考文献颅骨开窗自由落体打击法沿正中线做5 cm长的头皮切,于矢状缝偏右4 mm、冠状缝向尾侧4 mm交界处打开额骨,并咬开直径为6 mm的骨窗,然后安装好打击装置,硬脑膜充血水肿,造成中度脑损伤^[5-8](图1A)。

右侧胫骨骨折模型建立: 采用开放性胫骨骨折模型制

作方法^[9-12],麻醉生效后,把实验动物右下肢固定在手术台,于右胫骨中部做5 cm长的手术切口,摆锯将胫骨横向往断,克氏针髓内固定,缝合伤口(图1B)。脑损伤合并骨折模型模型具体同上。全部模型给予抗生素预防感染。

1.4.3 标本采集及检测 各组建模成功后6 h及3, 7, 14, 21, 28 d分别取4组大白兔耳缘静脉血3 mL,离心,取上清液后放置于-20 °C保存待测,每个时间取点6只兔。同时采用腰椎穿刺技术获取脑脊液0.3 mL^[13-16], -20 °C保存待测,每个时间点取6只兔。

各组造模成功后于骨折后第 1, 4, 8 周将单纯骨折组及颅脑创伤合并骨折组每个时间点取4只兔麻醉后处死,取全长胫骨(图2A),并浸入40 g/L多聚甲醛液,采用双能X射线检测仪并进行胫骨X射线检查;麻醉生效后立刻开始心内灌注,取出脑组织(图2B),观测出血的程度,作脑组织切片,观测脑组织病理变化。

1.5 主要观察指标 记下两组兔在脑创伤后的心率、呼吸频率及行为等发生的变化。采用颅脑创伤严重程度评分(Neurological Severity Score, NSS)量表^[17-19],包括皮肤颜色、排尿和排便、体位前肢位置功能、后肢位置功能、放置反射、步态、平衡、本体反射、翻正反射、屈曲反射及抓握;评分标准:0=障碍,1=正常。

将单纯骨折组及颅脑创伤合并骨折组模型胫骨标本运用Perkins等^[20]骨痂体积计算的方法计算 $V=2\pi r_1(r_2-r_1)L$,其中 r_1 为骨半径, r_2 为骨痂半径, L 为骨痂长度,将骨痂进行病理切片,计算机系统量化处理,主要参数为:骨小梁平均宽度(TW)、骨小梁面积比(TV%)及血管数目进行比较。

各组血清及脑脊液中神经生长因子、降钙素基因相关肽及胰岛素样生长因子1水平采用ELISA试剂盒(北京城林生物生物科技有限公司)检测。

1.6 统计学分析 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,全部的数据处理分析全部借助SPSS 19.0软件完成,对多组均数间比较行单因素方差分析,成组设计的计量资料采用两独立样本的

t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 在整个实验过程中, 颅脑损伤合并骨折模型动物死亡2只, 空白对照组死亡1只, 后期均进行补做, 最终48只兔进入结果分析。

2.2 兔一般情况变化 所有颅脑损伤的实验动物较空白对照组, 均出现呼吸明显加深加快约持续时间约2 min, 后逐渐恢复平稳, 角膜及耳廓反射减弱。

2.3 各组兔神经功能变化 NSS评分见表1。建模后6 h所得分数显著低于对照组($P < 0.05$), 建模后4周逐渐趋于稳定。

2.4 各组骨折修复情况 X射线拍片显示, 单纯骨折组和颅脑损伤合并骨折组两组建模后7 d无明显差异, 建模后4周两组均有骨痂呈现, 但颅脑损伤合并骨折组较单纯骨折组愈合修复更好(图3); 建模后8周两组基本无显著差异。

2.5 各组骨痂体积测量结果 建模后4周颅脑损伤合并骨折组骨折周围骨痂的体积明显比单纯骨折组增大, 表明骨痂量显著增多, 而建模后8周两者未见明显差异(图4, 表2)。

2.6 各组骨痂骨组织细胞形态变化 苏木精-伊红染色显示, 建模后4周, 对照组: 神经元细胞表现锥体形, 胞核椭圆或类圆形, 蓝染; 单纯颅脑损伤组: 镜下见受损部位神经细胞普遍肿胀, 气球样变, 胞质红染显著增强, 并出现核固缩、核碎裂, 核仁溶解等表现(图5)。

2.7 各组骨痂骨组织形态变化 建模后1周, 颅脑损伤合并骨折组骨折处骨痂内可以找到十分不成熟的骨小梁以及表现为层状分布的成骨细胞。建模后4周, 颅脑损伤合并骨折组骨折局部骨痂中骨小梁显著增多、更加成熟, 呈网格状或呈海绵状, 有功能比较活分的成骨细胞、成纤维细胞以及破骨细胞同时存在, 而单纯骨折组骨痂中的骨小梁比较稀少, 骨小梁呈不规则排列(图6); 建模后8周, 颅脑损伤合并骨折组骨小梁变得更加成熟, 其塑建程度高于单纯骨折组。

2.8 骨痂中相关参数量化分析结果 建模后4周骨小梁平均宽度(TW)、骨小梁面积比(TV%)及血管数目颅脑损伤合并骨折组明显高于单纯骨折组($P < 0.05$); 模型制作后8周两组之间未见明显差异(表3)。

2.9 各组血清及脑脊液3种因子水平的ELISA检测结果

各组血清降钙素基因相关肽水平: 建模后第3天颅脑损伤合并骨折组、单纯颅脑损伤组和单纯骨折组血清中降钙素基因相关肽浓度显著高于对照组并且浓度达到高峰, 其中颅脑损伤合并骨折组明显高于单纯颅脑损伤组及单纯骨折组($P < 0.05$); 建模后第7天颅脑损伤合并骨折组、单纯颅脑损伤组、单纯骨折组血清中浓度降低, 但依旧高于对照组($P < 0.05$); 建模后14天单纯颅脑损伤组、单纯骨折组、对照组之间浓度未见明显差异, 但颅脑损伤合并骨折组浓度仍然高于对照组; 其后各组降至正常水平(表4)。

各组脑脊液降钙素基因相关肽水平: 建模后第3天, 颅

脑损伤合并骨折组与单纯颅脑损伤组浓度均显著升高, 并达到峰值并与单纯骨折组、对照组对比差异有显著性意义($P < 0.05$), 但颅脑损伤合并骨折组与单纯颅脑损伤组之间未见明显差异。建模后7 d, 颅脑损伤合并骨折组和单纯颅脑损伤组浓度较建模后3 d时显著降低, 但仍然高于单纯骨折组和对照组(表5)。

各组血清胰岛素生长因子1水平: 建模后第3天时除正常对照组外, 其他3组胰岛素生长因子1质量浓度逐步升高, 建模后第14天达到高峰值, 随后又有所下降, 建模后第28天时各组质量浓度仍高于正常对照组; 每个组在同一时间对比, 脑损伤合并骨折组其血清中的胰岛素生长因子1质量浓度显著高于另外3组($P < 0.05$); 单纯脑损伤组含量次之, 且均高于单纯骨折组($P < 0.05$; 表6)。

各组脑脊液胰岛素生长因子1水平: 建模后6 h, 4组未见明显差异。在骨折第3天时, 颅脑损伤合并骨折组与单纯颅脑损伤组脑脊液中胰岛素生长因子1质量浓度升高, 并与单纯骨折组及对照组对比差异有显著性意义($P < 0.05$)。建模后第7天颅脑损伤合并骨折组与单纯颅脑损伤组脑脊液胰岛素生长因子1质量浓度达到最高值, 且两者之间浓度未见明显差异, 后期逐渐降低。在建模后第14天, 依旧高于对照组及单纯骨折组(表7)。

各组血清神经生长因子水平: 在建模后6 h, 4组浓度之间未见明显差异; 之后除对照组外其他3组神经生长因子质量浓度逐渐增加, 在建模后第14天达高峰, 颅脑损伤合并骨折组除建模后6 h外其他各时刻均高于其他组, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 在建模后第3, 7, 14天单纯颅脑损伤组神经生长因子质量浓度显著高于单纯骨折组($P < 0.05$; 表8)。

各组脑脊液神经生长因子水平: 建模后第3天, 颅脑损伤合并骨折组与单纯颅脑损伤组质量浓度上升, 并与单纯骨折组、对照组相比有显著差异($P < 0.05$)。建模后第7天颅脑损伤合并骨折组与单纯颅脑损伤组浓度达到峰值, 两者之间无显著差异; 建模后第14, 21天, 颅脑损伤合并骨折组与单纯颅脑损伤组脑脊液神经生长因子质量浓度, 逐渐降低但仍然高于对照组及单纯骨折组(表9)。

3 讨论 Discussion

良好的实验模型应拥有以下几点^[21]: 动物模型的受伤机制与临床复制性以及其稳定性好, 严重程度可以实现量化等。实验是用神经系统较发达的新西兰大白兔模型, 实验结果更加接近临床实际。传统的造模方法中, 脑损伤造模方法主要有^[22]: ①颅骨开槽自由落体撞击法; ②颅骨保持完整的广泛性脑损伤打击法; ③单摆式撞击致伤法; ④脑冻伤法。实验采用颅骨开槽自由落体撞击法加胫骨截骨克氏针内固定法, 该方式可以直接暴露硬脑膜, 及骨折部位这种方式精确度较高。在整个实验过程中另外一个难点是脑脊液的采集方式, 前期实验拟从枕大池获取脑脊液,

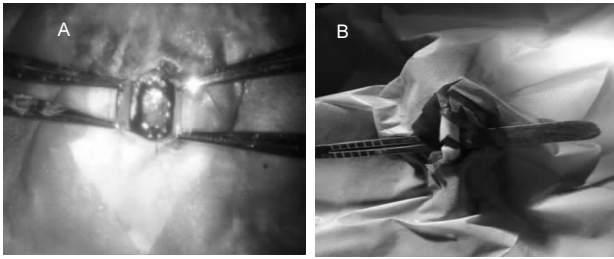


图1 颅脑损伤合并右侧胫骨骨折模型兔的构建

Figure 1 Establishment of a rabbit model of traumatic brain injury combined with tibial fracture

图注: 图中 A 为颅脑损伤模型; B 为右侧胫骨骨折模型。

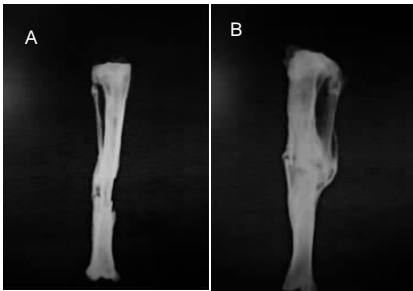


图3 单纯骨折组及颅脑创伤合并骨折组建模后4周骨痂形态

Figure 3 Callus morphology in the simple tibial fracture and tibial fracture combined with brain injury groups at 4 weeks after modeling

图注: 图 A, B 分别为单纯骨折组及颅脑创伤合并骨折组, 其中颅脑创伤合并骨折组(B)较单纯骨折组(A)骨痂愈合修复更好。

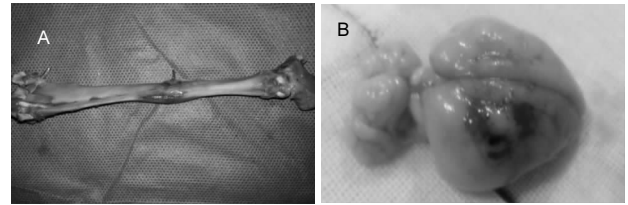


图2 兔胫骨骨折标本及损伤后脑组织标本形态

Figure 2 Rabbit tibia and traumatic cerebral tissue samples

图注: 图 A 为兔胫骨骨折标本形态; B 为损伤后脑组织标本形态。

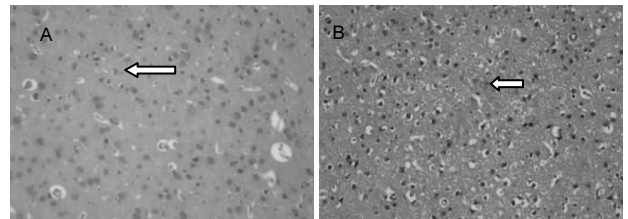


图5 对照组及单纯颅脑创伤组兔脑组织形态变化(苏木精-伊红染色, ×200)

Figure 5 Histological changes of the rabbit brain in the control and simple brain injury groups (hematoxylin-eosin staining, x200)

图注: 图 A 为对照组细胞胞质蓝染(箭头所指); B 为单纯颅脑创伤组细胞核碎裂(箭头所指)。

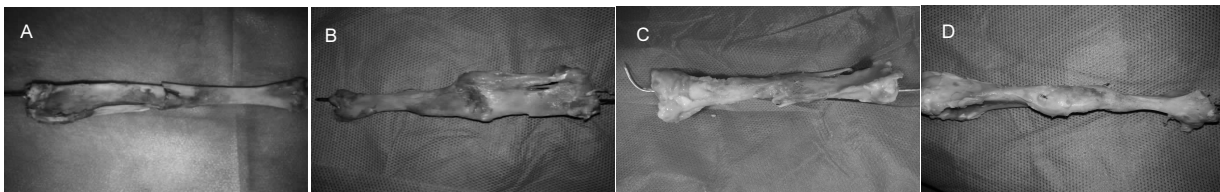


图4 单纯骨折组及颅脑创伤合并骨折组骨痂形态

Figure 4 Callus morphology in the simple tibial fracture and tibial fracture combined with brain injury groups

图注: 图 A 为单纯骨折组建模后4周, 少量骨痂; B 为颅脑创伤合并骨折组建模后4周, 骨痂较多; C 为单纯骨折组建模后8周, 骨折线消失; D 为颅脑创伤合并骨折组建模后8周, 骨折线消失。

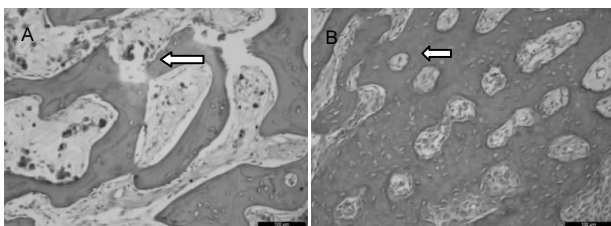


图6 单纯骨折组及颅脑创伤合并骨折组建模后4周骨组织形态(苏木精-伊红染色, 标尺: 100 μm)

Figure 6 Histological changes of the tibia in the simple tibial fracture and tibial fracture combined with brain injury groups at 4 weeks after modeling (hematoxylin-eosin staining, x200)

图注: 图 A 为单纯骨折组骨小梁稀疏; B 为颅脑创伤合并骨折组骨小梁致密。

但造成实验动物的瘫痪及死亡率较高, 不能达到满意的效果, 后期实验一致采用腰椎穿刺的方法, 用1 mL 无菌注射器于下腰椎进行穿刺, 该方法安全性高, 获取脑脊液量可观, 同时引起感染概率较低, 但需要操作者较高的穿刺技巧。

表1 脑损伤前后神经功能评分(NSS)评分结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$, 分)

Table 1 Neurological severity scores before and after brain injury

时间	空白对照组	单纯颅脑创伤组
建模后6 h	11.81±0.55	9.32±0.68 ^a
建模后7 d	12.07±0.42	8.01±0.56 ^a
建模后4周	12.02±0.38	7.75±0.66 ^a
建模后8周	11.98±0.67	8.12±0.75 ^a

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。

于立明等^[23]研究发现神经营养因子以及其受体能够在未发生骨折的下颌骨中表达, 从而证明神经营养因子与骨的正常生理活动密切相关。有学者提出其加速骨折修复的机制为神经生长因子通过诱导神经元细胞发育, 通过复杂的神经系统调控骨折周围的血液流量同时诱导新生血管生长^[24]。也可以介导骨形态发生蛋白(BMPs)的表达, 增强软骨以及骨连接的形成从而加快骨质修复^[25]。

表 2 两组不同时间点骨痂体积测量值的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$, cm^3)

Table 2 Comparison of the volume of callus between two groups at different time points

组别	建模后时间		
	7 d	4 周	8 周
单纯骨折组	0.45±0.11	1.19±0.12	1.06±0.12
颅脑损伤合并骨折组	0.49±0.13	1.81±0.13 ^a	1.28±0.11

表注: 与单纯骨折组相比, ^a $P < 0.05$ 。表 3 两组不同时间点骨痂成分检测值的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 3 Comparison of the callus compositions between two groups at different time points

时间	组别	骨小梁面积比(%)	骨小梁平均宽度(μm)	血管数目(n)
建模后 4 周	单纯骨折组	38.57±3.26	50.05±4.01	4.72±2.1
	颅脑创伤合并骨折组	53.77±2.98 ^a	68.54±3.21 ^a	10.88±3.2 ^a
建模后 8 周	单纯骨折组	46.28±4.21	68.54±3.21	8.65±2.5
	颅脑创伤合并骨折组	48.86±3.51	65.32±4.11	7.91±3.4

表注: 与建模后 4 周相比, ^a $P < 0.05$ 。

表 4 不同时间点各组血清中降钙素基因相关肽水平的比较

($\bar{x} \pm s$, $n=6$, ng/L)

Table 4 Comparison of the serum level of calcitonin gene-related peptide among groups at different time points

组别	建模后时间					
	6 h	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照组	6.91±0.67	7.05±0.31	7.13±0.38	6.87±0.44	6.99±0.21	7.22±0.54
单纯颅脑创伤组	6.56±0.61	9.02±0.54 ^a	7.49±0.35 ^a	6.94±0.68	6.93±0.87	6.63 ±0.58
单纯骨折组	7.26±0.53 ^b	9.41±1.19 ^a	8.30±0.34 ^a	6.42±0.46	6.61±0.33	7.03 ±0.41
颅脑创伤合并骨折组	7.62±0.44	11.59±0.55 ^{abc}	9.48±1.21 ^{abc}	8.23±0.59 ^{abc}	7.39±0.51	7.36±0.46

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与单纯颅脑创伤组相比, ^b $P < 0.05$; 与单纯骨折组相比, ^c $P < 0.05$ 。

表 5 不同时间点 4 组脑脊液中降钙素基因相关肽水平的比较

($\bar{x} \pm s$, $n=6$, ng/L)

Table 5 Comparison of the cerebrospinal fluid level of calcitonin gene-related peptide among groups at different time points

组别	建模后时间					
	6 h	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照组	25.78±1.08	26.81±1.27	26.78±1.11	27.5±0.96	26.32±1.51	27.45±0.83
单纯颅脑创伤组	25.33±1.33	34.24±1.53 ^a	32.24±0.78 ^a	26.98±1.24	28.46±1.88	26.43±1.42
单纯骨折组	26.53±0.91	25.34±2.17 ^b	27.14±1.74 ^b	26.25±2.01	26.12±0.37	27.48±2.07
颅脑创伤合并骨折组	25.66±1.99	33.10±1.23 ^{ac}	30.26±1.30 ^{ac}	27.50±1.88	27.76±1.53	26.57±0.43

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与单纯颅脑创伤组相比, ^b $P < 0.05$; 与单纯骨折组相比, ^c $P < 0.05$ 。

表 6 不同时间点 4 组血清中胰岛素样生长因子 1 水平的比较

($\bar{x} \pm s$, $n=6$, ng/L)

Table 6 Comparison of the serum level of insulin-like growth factor-1 among groups at different time points

组别	建模后时间					
	6 h	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照组	23.58±2.07	23.24±1.58	24.24±1.93	24.15±0.73	24.11±0.85	24.16±1.56
单纯颅脑创伤组	24.22±1.12	28.90±0.98 ^a	31.01±0.94 ^a	32.85±1.23 ^a	30.06±1.23 ^a	27.97±0.72 ^a
单纯骨折组	24.14±1.52	27.26±0.68 ^{ab}	28.91±0.78 ^{ab}	30.76±1.16 ^{ab}	28.10±0.89 ^{ab}	26.59±0.95 ^{ab}
颅脑创伤合并骨折组	24.91±0.87	31.41±1.24 ^{abc}	34.11±1.10 ^{abc}	37.06±1.35 ^{abc}	34.01±1.20 ^{abc}	31.67±1.02 ^{abc}

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与单纯颅脑创伤组相比, ^b $P < 0.05$; 与单纯骨折组相比, ^c $P < 0.05$ 。

实验研究中显示, 实验组无论在脑脊液还是血清中神经生长因子质量浓度均表现为先升高, 后降低的变化趋势, 并且各组脑脊液中各时间点浓度均高于血清, 说明神经生长因子以高浓度存在于脑脊液中; 并且脑损伤后其浓度高于非脑损伤组, 说明颅脑损伤是造成脑脊液中神经生长因子浓度上升的关键因素; 除正常对照组外, 其他3组血清中神经生长因子于建模后第3天时开始升高, 第14天到达最

高值, 其中颅脑损伤合并骨折除建模后6 h外其他各时间点均高于其他组, 说明血清中神经生长因子可分为两个来源: 第一, 骨折后, 骨折局部的神经纤维生长, 合成释放部分神经生长因子; 第二, 脑损伤后脑组织合成大量神经生长因子, 又因血脑屏障破坏, 使得脑脊液中的神经生长因子进入外周血液循环。实验发现单纯骨折组血清中神经生长因子浓度变化幅度低于脑损伤合并骨折组, 表明颅脑创伤是

表 7 不同时间点 4 组脑脊液中胰岛素样生长因子 1 水平的比较

($\bar{x} \pm s$, $n=6$, ng/L)

Table 7 Comparison of the cerebrospinal fluid level of insulin-like growth factor-1 among groups at different time points

组别	建模后时间					
	6 h	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照组	11.35±1.34	11.07±1.27	11.88±0.82	11.51±1.51	11.61±1.33	11.9 ±0.96
单纯颅脑创伤组	11.67±1.03	14.85±0.45 ^a	18.81±1.09 ^a	15.07±0.96 ^a	13.63±1.35	11.86±1.18
单纯骨折组	10.23±1.12	11.41±1.05 ^b	11.65±1.14 ^b	11.23±1.08 ^b	11.48±1.45	12.61±0.95
颅脑创伤合并骨折组	12.36±0.97	15.43±1.66 ^{ac}	19.52±1.31 ^{ac}	15.21±1.81 ^{ac}	13.51±1.45	12.82 ±1.75

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与单纯颅脑创伤组相比, ^b $P < 0.05$; 与单纯骨折组相比, ^c $P < 0.05$ 。

表 8 不同时间点 4 组血清中神经生长因子检测值的比较

($\bar{x} \pm s$, $n=6$, ng/L)

Table 8 Comparison of the serum level of nerve growth factor among groups at different time points

组别	建模后时间					
	6 h	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照组	77.54±2.61	77.85±2.32	80.48±3.24	77.88±3.87	80.23 ±2.72	76.82±3.59
单纯颅脑创伤组	77.85±2.11	91.98 ±2.25 ^a	96.23±1.35 ^a	100.49±1.48 ^a	91.75±2.25 ^a	80.14±2.19
单纯骨折组	78.95±2.04	86.88±2.84 ^{ab}	90.75±1.37 ^{ab}	94.45±2.70 ^{ac}	88.53±2.95 ^a	79.25±3.93
颅脑创伤合并骨折组	81.41±2.53	94.68±2.30 ^{abc}	102.46±3.75 ^{abc}	109.44±3.13 ^{abc}	95.71±1.93 ^{abc}	89.26±2.50 ^{abc}

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与单纯颅脑创伤组相比, ^b $P < 0.05$; 与单纯骨折组相比, ^c $P < 0.05$ 。

表 9 不同时间点 4 组脑脊液中神经生长因子检测值的比较

($\bar{x} \pm s$, $n=6$, ng/L)

Table 9 Comparison of the cerebrospinal fluid level of nerve growth factor among groups at different time points

组别	建模后时间					
	建模后 6 h	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照组	170.37±9.21	174.78±5.66	176.66±3.97	173.91±6.61	178.61 ±7.27	178.91±3.75
单纯颅脑创伤组	173.47±7.98	193.83±7.91 ^a	241.95±9.93 ^a	221.46±7.91 ^a	194.68±8.22 ^a	171.53±9.39
单纯骨折组	173.56±4.64	176.76±4.15 ^b	171.15±7.37 ^b	176.98±4.51 ^c	175.33±7.48 ^b	175.46±9.31
颅脑创伤合并骨折组	177.55±8.72	200.18±9.44 ^{ac}	250.01±11.19 ^{ac}	221.01±10.42 ^{ac}	200.98±8.83 ^{ac}	176.53±9.16

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与单纯颅脑创伤组相比, ^b $P < 0.05$; 与单纯骨折组相比, ^c $P < 0.05$ 。

增加外周神经生长因子浓度的关键因素。

有研究表明在能够产生降钙素基因相关肽的转基因大鼠中其成骨细胞的活性明显增强, 其促进成骨作用显著强于其破骨作用^[26-27]。孙东良等^[28]通过动物实验表明脑创伤后合并骨折, 骨折端降钙素基因相关肽在骨折修复的早中期表达增强, 有利于多种细胞趋化、增殖与分化, 促进成骨。实验结果表明, 降钙素基因相关肽与神经生长因子的表达变化规律基本一致, 所不同之处在于脑脊液中降钙素基因相关肽于脑损伤后 3 天达到峰值, 而神经生长因子为建模后第 7 天; 在血清之中降钙素基因相关肽于脑损伤后第 3 天达高峰, 而神经生长因子建模后第 14 天达高峰, 由此可见降钙素基因相关肽达高峰时间均比神经生长因子提前, 对于脑创伤后的变化更加敏感。

胰岛素样生长因子 1 可以与成骨细胞表面受体结合胰岛素样生长因子 1 受体结合, 活化酪氨酸激酶, 激活下游胰岛素受体底物, 加速成骨细胞增殖加强骨矿物质沉积, 从而

加快骨折修复^[29-30]。有学者认为胰岛素生长因子 1 在骨折修复早中期发挥着重要作用^[31], 而实验可见颅脑损伤合并骨折组及单纯颅脑创伤组伤后, 神经生长因子于脑脊液中建模后第 7 天达到高峰, 在血清中为建模后第 14 天达高峰, 进一步验证的该说法。但在整个实验中脑脊液中神经生长因子浓度低于外周血清浓度, 其中的转运机制尚不明确。

整个实验过程中, 随时间的推移脑脊液及血清中因子浓度逐渐降低, 这可能是伴随着脑损伤的修复, 向血液中释放减少的缘故。

因此, 颅脑损伤后可以促进骨折愈合。降钙素基因相关肽、神经生长因子及胰岛素样生长因子 1 是促进骨折愈合的相关因素, 其作用机制可能是通过中枢脑组织合成后释放入血而发挥作用。降钙素基因相关肽在促进骨折愈合方面, 其发挥时效较神经生长因子及胰岛素样生长因子 1 更早。

作者贡献: 实验设计为第一作者和通讯作者, 实验实施为第一、二、三、四作者, 实验评估为第二作者和通讯作者, 资料收集为第一、二作者。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案符合相关伦理学要求, 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

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: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。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。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 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。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Smith R. Head injury, fracture healing and callus. J Bone Joint Surg Br. 1987;69:518-520.
- [2] Spencer RF. The effect of head injury on fracture healing. A quantitative assessment. J Bone Joint Surg Br. 1987;69(4): 525-528.
- [3] Moore TJ. Functional outcome following surgical excision of heterotopic ossification in patients with traumatic brain injury. J Orthop Trauma. 1993;7:11-14.
- [4] Cadosch D. Functional and proteomic analysis of serum and cerebrospinal fluid derived from patients with traumatic brain injury: a pilot study. ANZ J Surg. 2010;80(7-8):542-547.
- [5] 徐婷, 吴昆, 顾星星, 等. 创伤性脑损伤后PHB2表达变化及其与星形胶质细胞增殖的相关性研究[J]. 中华神经医学杂志, 2017, 16(7):671-675.
- [6] 吴精川, 李辉, 何骏驰, 等. 创伤性脑损伤后大鼠脑组织miRNA-9表达变化及意义[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(14): 1458-1463.
- [7] 张胜利, 谢玲霞, 刘黎军, 等. 原癌基因c-fos和c-jun在创伤性脑损伤合并胫骨骨折大鼠中的表达[J]. 中华创伤骨科杂志, 2017, 19(5):429-433.
- [8] 陈旭红, 白露. 创伤性脑损伤对骨折愈合影响动物模型的建立与评估[J]. 北京大学学报(医学版), 2012, 44(6):831-837.
- [9] 郑凯, 于秀淳, 郭征, 等. 新型β钛合金半针低弹性模量外固定系统对实验犬胫骨骨折愈合的影响[J]. 中华创伤骨科杂志, 2014, 16(1):58-61.
- [10] 李立军, 庞小建, 朱福良, 等. 捆绑带束缚压力对兔胫骨骨折模型愈合影响的生物力学研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2014, 8(4):683-687.
- [11] 刘建军, 韩庆斌, 李新志, 等. 神经生长因子促进大鼠胫骨骨折愈合的实验研究[J]. 当代医学, 2017, 23(11):1-3.
- [12] 宋扬, 韩一生, 毕龙, 等. 创伤性脑损伤大鼠动物模型及其评价体系的建立[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2009, 8(6):521-524.
- [13] 华峰, 刘军, 黄野, 等. 连续、无血污染的兔脑脊液的采集[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2008, 28(2):263-264.
- [14] 杨子, 赖关朝, 王国彬, 等. SD大鼠脑脊液采集方法改进[J]. 中国职业医学, 2011, 38(2):117-119.
- [15] 张升, 辛艳飞, 顾利强, 等. Beagle犬脑脊液(CSF)多次采集手术模型的建立[J]. 实验动物科学, 2011, 28(5):69-71.
- [16] 吕田明, 潘志勇. 啮齿类动物脑脊液取样技术[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(24):11623-11626.
- [17] 段丽君, 姚梓平, 朱红英, 等. 不同电针刺激强度对急性脑缺血再灌注大鼠NSS与脑组织含水量的影响[J]. 新疆医科大学学报, 2016, 39(11):1420-1423.
- [18] 张睿, 杨祖悌, 张同寅, 等. 异氟烷对创伤性脑损伤大鼠的神经保护作用及作用机制研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2015, 23(8): 38-42.
- [19] 苏辉, 戴宜武, 邹德非, 等. 巴曲酶早期应用对大鼠脑创伤后神经功能恢复的促进作用[J]. 解放军医学院学报, 2016, 37(8):879-883.
- [20] 刘京敏, 史晨辉, 王维山, 等. 局部注射Neuritin促进骨折愈合的实验研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2012, 30(6):720-724.
- [21] 赵小纲, 赵光锋, 陈毅军, 等. 创伤性脑损伤影响骨折愈合速度的机制[J]. 中华急诊医学杂志, 2007, 16(9):936-939.
- [22] 张薇, 李丽新. 机械闭合性颅脑损伤实验动物模型的研究进展[J]. 德州学院学报, 2009, 25(4):107-110.
- [23] 于立明, 张伟, 陈坤, 等. 神经生长因子及其受体在下颌骨骨折愈合中的表达及意义[J]. 实用口腔医学杂志, 2011, 27(4):460-464.
- [24] 郭程亮, 吴双芝, 莱安平, 等. 神经生长因子联合组合式外固定架治疗骨不愈合的疗效观察[J]. 中国医药指南, 2012, 10(32):50-51.
- [25] 刘宇鹏, 赵德伟, 王卫明, 等. 神经生长因子对骨折愈合中骨形态发生蛋白表达的影响[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(23):1825-1828.
- [26] 刘晓丹, 李春风, 谷大海, 等. 成骨细胞的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(7):53-58.
- [27] 孙嵩, 高强国, 张纲, 等. 神经生长因子调控降钙素基因相关肽的表达及对MG-63细胞增殖的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2015, 33(3):234-237.
- [28] 孙东良, 陈通, 付爱军, 等. 颅脑损伤合并股骨闭合性骨折大鼠模型的建立及骨痂中降钙素基因相关肽的表达及意义[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2014, 17(7):1123-1126.
- [29] Kaur G, Valarmathi MT, Potts JD, et al. Regulation of osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells on 2D nanorod substrates. Biomaterials. 2010;31:1732-1741.
- [30] Yeni YN, Dong XN, Zhang B, et al. Cancellous bone properties and matrix content of TGF-beta2 and IGF-I in human tibia: a pilot study. Clin Orthop Relat Res. 2009;467: 3079-3086.
- [31] 贺军, 林杨景, 向登, 等. 血清胰岛素样生长因子1在骨折合并脑损伤患者血清中的表达及其意义[J]. 中国医药, 2014, 9(11): 1656-1660.