

• 基础研究 •

脑外伤对骨折愈合中血管内皮生长因子表达的影响

刘志奎, 张柳, 姜晓华, 穆树林, 孙晓新

[摘要] 目的 探讨脑外伤对骨折愈合的影响及作用机制。方法 12 周龄雌性 SD 大鼠随机分成 2 组:骨折合并脑外伤组和单纯骨折组。建立骨折及脑外伤模型,术后 1 周、2 周、3 周、4 周截取骨痂,HE 染色观察骨痂生长情况,免疫组织化学染色及原位杂交检测血管内皮生长因子(VEGF)及其 mRNA 表达。结果 HE 染色示单纯骨折组呈典型骨折愈合过程,而骨折合并脑外伤组骨痂形成及改造提前。骨折合并脑外伤组术后 1~4 周骨痂中 VEGF 及其 mRNA 阳性细胞百分率分别高于同一时间点单纯骨折组($P<0.05$)。结论 脑外伤对骨折愈合有促进作用,可能与脑外伤后 VEGF 表达水平升高有关。

[关键词] 骨折;愈合;脑外伤;血管内皮生长因子;大鼠

Effect of Traumatic Brain Injury on Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Femoral Fracture Callus in Rats LIU Zhi-kui, ZHANG Liu, JIANG Xiao-hua, et al. Department of Orthopedics, Hospital Affiliated to North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of the traumatic brain injury on the fracture healing and the related mechanism. **Methods** 64 12-week-old SD rats were randomly divided into 2 groups: The femoral fracture with a brain injury group and the femoral fracture group. The bone callus was obtained 1, 2, 3 and 4 week after operation respectively, and observed with the HE staining. The vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF mRNA in the callus were detected with immunohistochemical staining and hybridization in situ. **Results** The formation and reforming of the callus in group with brain injury were ahead to only fracture. The percentages of the cells positive for VEGF and VEGF mRNA in the callus were more in group with brain injury than in pure fracture group at the same time point ($P<0.05$). **Conclusion** Traumatic brain injury can promote the healing of fracture, which is probably related to an increase in the expression of VEGF.

Key words: fracture; healing; traumatic brain injury; vascular endothelial growth factor (VEGF); rats

[中图分类号] R651.1, R683 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2009)03-0233-03

[本文著录格式] 刘志奎, 张柳, 姜晓华, 等. 脑外伤对骨折愈合中血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2009, 15(3): 233—235.

临床上,当四肢骨折伴随脑损伤时,骨折处往往可见骨痂过度生长,甚至在肌肉中出现异位骨化,骨折愈合明显快于单纯的四肢骨折。尽管临床和实验研究均支持中枢神经损伤促进骨折愈合的结论^[1-3],但其作用机理仍未明确。骨折愈合是个复杂的过程,受到各种因素的控制,其中起主要作用的是局部骨生长因子或细胞因子。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)具有强大的促进血管内皮细胞增生和促血管生成作用,体内外实验均证明,VEGF 在骨折愈合重建中发挥重要作用^[4]。我们检测骨折合并脑外伤时骨痂中 VEGF 及其基因的表达,探讨 VEGF 在骨折合并脑外伤时骨折愈合中可能的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 12 周龄,体重 250~310 g,雌性 SPF 级 Sprague-Dawleysd 大鼠 64 只;北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号(京)2002-0003。所有动物置于 20℃左右和自然光照的动物房中单笼饲养,适应环境 1 周。随机分为单纯骨折组 32 只、骨折-脑损伤组 32 只,每组再分为骨折术后 1、2、3、4 周等 4 个观察亚

组,每亚组 8 只大鼠。VEGF SP 一抗、SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒、原位杂交试剂盒均由天津灏洋生物工程公司提供。

1.2 模型制作 采用 10%水合氯醛 0.3 ml/100 g 腹腔注射麻醉。骨折-脑损伤组显露右颅顶骨,分离骨膜,于中线旁 2 mm 处紧邻冠状缝开一直径 5 mm 骨窗,暴露硬脑膜,将 20 g 砝码自 30 cm 高处通过导向杆自由坠落,撞击置于硬脑膜上的圆锥致中度脑损伤^[5]。两组大鼠均取右下肢股外侧切口,钝性分离至股骨干,在中间用线锯断成横行骨折,然后以直径 1.5 mm 克氏针逆行从大粗隆穿出,复位后将克氏针顺行穿入股骨远端髓腔,确认牢固后,分层关闭切口^[6]。肌肉注射青霉素 5×10^4 U/d 至术后 3 d。

1.3 标本的制备 每亚组在预定时间点于无菌条件下以骨痂为中心截取股骨中 1/3 段(包括骨痂、皮质骨、骨髓部分),迅速去除周围软组织,用冷生理盐水冲洗后立即投入 40 g/L 多聚甲醛中固定 12 h,200 g/L 乙二胺四乙酸(EDTA)-2Na 脱钙完全后,依次脱水、透明、浸蜡、包埋。

1.4 HE 染色 制备厚 5 μ m 石蜡切片,脱蜡、水化、苏木素染核、盐酸酒精分化、伊红染浆、脱水透明,中性树胶封片,光镜下观察骨痂生长情况及其组织形态。

1.5 免疫组织化学染色 制备厚 5 μ m 石蜡切片,常

作者单位:华北煤炭医学院附属医院骨科,河北唐山市 063000。
作者简介:刘志奎(1967-),男,河北唐山市人,硕士,副主任医师,主要研究方向:创伤骨科。通讯作者:张柳。

规脱蜡至水,3%双氧水封闭内源性过氧化氢酶,5%山羊血清封闭非特异性抗原,加一抗(1:100)4℃孵育过夜。滴加生物素化二抗,高敏过氧化物酶复合物,DAB显色,苏木素复染。每次染色均用PBS液代替一抗作为阴性对照。

1.6 原位杂交 使用 VEGF 原位杂交检测试剂盒,探针序列为:ATG TTC CT;合成序列:5'-AGG AAC ATT TAC ACG TCT GCG GAT CTT G。操作按试剂盒提供的步骤进行,切片经3%过氧化氢处理,复合液消化暴露 mRNA 片段,滴加寡核苷酸探针,37℃杂交过夜,滴加封闭液,生物素标记地高辛抗体,DAB显色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,镜检。每次染色均用寡核苷酸阴性探针杂交液代替杂交工作液作为阴性对照。

采用 HPIAS-1000 高清晰度彩色图像分析系统(同济医科大学千屏影像工程公司),在200倍视野下,随机选取6个视野,统计每个视野总的细胞数和阳性细胞数,计算阳性细胞百分数,取6个视野的平均值为阳性细胞百分数。

1.7 统计学方法 实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析和 *t* 检验。显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HE 染色 骨折-脑损伤组1周镜下可见成骨细胞数目较单纯骨折组增多,骨折端有大量肉芽组织生长连接,软骨细胞出现,纤维骨痂生成(中插彩图3.1);2周镜下可见骨折端有大量纤维性骨痂和软骨性骨痂,出现编织骨痂,新生骨小梁长入,其中有丰富的血管再生(中插彩图3.3);3周镜下可见骨折端软骨骨痂减少,出现大量的编织骨痂,其中成骨细胞活跃,出现破骨细胞,骨膜增厚明显(中插彩图3.5);4周镜下可见骨折端编织骨痂减少,大量的板层骨出现(中插彩图3.7)。单纯骨折组表现为典型的骨折愈合过程,骨痂呈梭形向外膨胀,骨膜反应轻,纤维骨痂量少,膜内成骨和软骨内成骨并存,以前者为主。骨折第1周镜下可见骨折端肉芽组织形成,新生血管出现,纤维母细胞自骨膜下增生长入骨折间隙,夹杂有少量的成骨

细胞(中插彩图3.2);2周镜下可见骨折端肉芽组织生长,纤维性骨痂生成,可见骨膜下成骨,软骨内成骨现象(中插彩图3.4);3周骨折端纤维母细胞减少,纤维性骨痂减少,代之以软骨骨痂和编织骨痂(中插彩图3.6);4周骨折端纤维骨痂消失,软骨骨痂减少,编织骨痂增多,并出现板层骨(中插彩图3.8)。

2.2 免疫组织化学染色 术后1周骨膜内增殖细胞,骨折断端周围肉芽组织中的纤维母细胞、间充质细胞、血管内皮细胞、早期软骨细胞及成骨细胞胞浆中均有广泛的 VEGF 阳性表达。骨折-脑损伤组阳性细胞数量多于单纯骨折组,并且显色强(中插彩图3.9、图3.10)。术后2周,上述细胞仍持续阳性表达,但间充质细胞的阳性表达已经开始减弱,骨折-脑损伤组阳性细胞数量多于单纯骨折组(中插彩图3.11、图3.12)。术后3周,成骨细胞表达持续增强,骨折-脑损伤组阳性细胞数量多于单纯骨折组(中插彩图3.13、图3.14)。术后4周,骨细胞有表达,成骨细胞表达减弱,但骨折-脑损伤组阳性细胞数量多于单纯骨折组(中插彩图3.15、图3.16)。图像分析显示,骨折-脑损伤组平均阳性细胞百分数均高于同一时间点单纯骨折组($P<0.05$)。见表1。

2.3 原位杂交 术后1周时,在炎细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞内检测到大量的 VEGF mRNA 阳性表达,骨细胞的表达也增加。骨折-脑损伤组阳性细胞数量多于单纯骨折组(中插彩图3.17、图3.18)。术后2周,骨折处多种组织和细胞 VEGF mRNA 表达明显增强,骨细胞、成骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞都参与表达 VEGF mRNA,骨折-脑损伤组阳性细胞数量多于单纯骨折组(中插彩图3.19、图3.20)。术后3周,VEGF mRNA 阳性进一步表达,主要在骨细胞和成骨细胞内,骨折-脑损伤组阳性细胞数量多于单纯骨折组(中插彩图3.21、图3.22)。术后4周,骨细胞和成骨细胞阳性表达开始下降,但骨折-脑损伤组阳性细胞数量多于单纯骨折组(中插彩图3.23、图3.24)。图像分析显示,骨折-脑损伤组平均阳性细胞百分数均高于同一时间点单纯骨折组($P<0.05$)。见表2。

表 1 两组骨痂中 VEGF 阳性细胞百分率(%)

组别	n	1 周	2 周	3 周	4 周
骨折-脑外伤组	8	0.742±0.014	0.773±0.012	0.761±0.014	0.726±0.025
单纯骨折组	8	0.691±0.027	0.727±0.018	0.699±0.026	0.668±0.018
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 2 两组骨痂中 VEGF mRNA 阳性细胞百分率(%)

组别	n	1 周	2 周	3 周	4 周
骨折-脑外伤组	8	0.733±0.011	0.753±0.014	0.749±0.022	0.702±0.014
单纯骨折组	8	0.663±0.028	0.693±0.020	0.691±0.028	0.642±0.021
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

血管生成在骨折愈合过程中具有重要意义。新的

血管形成可能与诸多因素有关,其中 VEGF 有促进内皮细胞增殖和血管生成,增加骨通透性作用。

VEGF 可以直接作用于成骨细胞,并可以结合成骨细胞,增加其移行和分化功能。国外实验发现,骨折部位的成骨细胞具有 VEGF-1 和 VEGF-2 受体的表达^[7]。国内扬操发现,VEGF 可以促进骨组织内血管再生^[8]。初同伟等应用外源性 VEGF 及其多克隆抗体发现,用 VEGF 组骨折端局部血流明显高于对照组,而使用抗 VEGF 抗体组者出现骨不连及不愈合^[9]。这些都表明 VEGF 对骨折愈合的影响。

VEGF 还可以促进软骨细胞成骨。Hagmal 等发现,VEGF 诱导血管长入软骨,从而使软骨内成骨增强,加速骨折愈合^[10]。钟刚等也发现,试验组大鼠股骨骨折端出现明显的软骨内成骨现象,表明 VEGF 对骺板生成过程中血管渗入起重要作用^[11],这对促进软骨内成骨,进而在软骨愈合中发挥重要作用。在我们的研究中,免疫组织化学染色和原位杂交结果显示骨痂组织中有 VEGF 及其 mRNA 的表达,且在 1~4 周时均有较强阳性表达,提示 VEGF 参与了骨折愈合的修复过程。

合并脑外伤骨折患者骨折愈合明显加快的现象一直备受关注。Kim 等实验发现,合并脑外伤的大鼠股骨干骨折愈合时间需要 2 周,而单纯股骨干骨折愈合时间需要 4 周,脑外伤组骨痂数量明显多于单纯骨折组^[2]。这与我们的结果近似。Onodera 等实验表明,受损的脑组织及脑垂体中含有大量的生长因子及炎性细胞,而后者又能释放多种细胞因子入血^[12]。故脑外伤对血清中生长因子含量有很大影响。一些实验表明,骨折合并脑外伤组胰岛素样生长因子 1(IGF-1)、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)血清中含量明显高于单纯骨折组^[13-15];脑外伤后血清中一些生长因子对未分化的间充质干细胞有更强的促有丝分裂能力和对骨髓基质干细胞增值有促进作用^[3,13]。王守君等发现,骨折合并脑外伤组骨痂组织中 TGF- β_1 阳性表达明显高于单纯骨折组,认为这是脑外伤后 TGF- β_1 向骨折局部聚集,调节骨折愈合的结果^[16]。郭启等发现,骨折合并脑外伤组 1、2 周时骨痂中骨形成蛋白 2(bone morphogenetic protein 2, BMP-2)表达明显高于单纯骨折组^[17]。

我们发现,骨折合并脑外伤组 1~4 周时 VEGF 和 VEGF mRNA 表达均显著高于同一时间点的单纯骨折组;脑外伤后大鼠骨折愈合加速,骨痂量增多,VEGF 表达明显增强,表明脑外伤后 VEGF 对骨折愈合有促进作用。其可能机制包括:①脑外伤后由于血脑屏障的破坏,受损脑组织直接释放促有丝分裂活性物质进入血循环;②脑外伤后脑垂体神经分泌功能失调,致使血清中催乳素等体液因素含量升高,作用于骨折周围组织使之以旁分泌方式释放促成骨活性组织;

③脑外伤后血清中生长因子含量发生变化,如 IGF-1、TNF- α 、bFGF 明显增高,而这些因子可以促进多种细胞因子表达;④脑外伤后抑制或消耗皮质类固醇等抗炎物质的活动,使骨折出血增加,组织缺氧增加,刺激 VEGF 增加;⑤脑外伤后,中枢系统对周围神经抑制减弱,从而使骨折处骨痂内感觉神经释放神经生长因子,而神经生长因子与血管内皮细胞上的受体结合,可促进血管内皮增生,刺激产生 VEGF。

我们的实验结果表明,脑外伤促进了骨折部位 VEGF 表达,而后者又促进了骨折的愈合,VEGF 可能在脑外伤加速骨折愈合中起了重要的作用。骨组织细胞只有在各种细胞因子协同作用下,才能完成骨质吸收和新骨的生成,而 VEGF 只是其中之一,它与其他生长因子的相互关系还不十分清楚。脑外伤加速骨折愈合的确切机制需要进一步研究。

[参考文献]

- [1]王心,宋跃明,裴福兴. 中枢神经损伤大鼠骨痂中神经肽的表达[J]. 中国矫形外科杂志,2006,14(16):1261-1263.
- [2]Kim KH, Kim HS, Moon SH, et al. Animal model and gene expression analysis during the accelerated fracture healing in traumatic brain injury[J]. J Korean Orthop Res Soc,2003,6(2):177-185.
- [3]Boes M, Kain M, Kakar S, et al. Osteogenic effects of traumatic brain injury on experimental fracture-healing[J]. J Bone Joint Surg (Am),2006,88(4):738-743.
- [4]初同伟,王正国,朱佩芳,等. 骨折愈合过程中血管内皮生长因子及其受体的表达[J]. 中华创伤杂志,2001,17(6):344-346.
- [5]王清华,徐如祥,李良平,等. 大鼠不同程度脑损伤模型的建立[J]. 创伤外科杂志,2000,2(1):42-45.
- [6]Li C, Mori S, Li J, et al. Long term effect of incadronate disodium (YM-175) on fracture healing of femoral shaft in growing rats[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(3):429-436.
- [7]Petersen W, Pufe T, Zancop Y, et al. Expression of VEGFR-1 and VEGFR-2 in degenerative Achilles tendons[J]. J Orthop Res, 2004, 420(3):286-291.
- [8]扬操,扬述华,杜靖远,等. VEGF 基因转染促进股骨头坏死修复[J]. 临床骨科杂志,2004,7(1):90-93.
- [9]初同伟,王正国,朱佩芳,等. 骨折愈合过程中血流量的变化与 VEGF 的相关研究[J]. 中国矫形外科杂志,2002,9(6):577-579.
- [10]Hayami T, Funaki H, Yaeoda K. Expression of the cartilage derived anti-angiogenic factor chondromodulin-1 decreases in the early stage of experimental osteoarthritis[J]. J Rheumatol, 2003,30(10):2207-2217.
- [11]钟刚,裴福兴,樊瑜波,等. VEGF 基因转染促进骨折愈合的实验性研究[J]. 中华矫形外科杂志,2003,12(8):604-609.
- [12]Onodera S, Nishihira J, Yamazaki M, et al. Increased expression of macrophage migration inhibitory factor during fracture healing in rats[J]. Histochem Cell Biol,2004,121(3):209-217.
- [13]周海滨,郑祖根,董启榕,等. 骨折合并中枢神经损伤后其愈合加速的原因[J]. 骨与关节损伤杂志,2004,19(4):227-229.
- [14]汪学军,裴福兴,池雷霆,等. 骨折合并脑外伤时骨愈合过程中 bFGF 作用的实验研究[J]. 中华骨科杂志,2003,23(1):54-56.
- [15]孙良智,张柳,王守君,等. 大鼠股骨骨折合并脑损伤骨折愈合过程中胰岛素样生长因子 1 在血清和骨痂中的表达[J]. 中国临床康复,2006,10(40):60-62.
- [16]王守君,张柳,孙良智,等. 大鼠股骨骨折合并脑外伤时骨愈合过程中 TGF- β_1 的作用[J]. 第四军医大学学报,2006,27(15):1407-1410.
- [17]郭启,张柳. 脑外伤对骨折愈合中骨形成蛋白 2 表达的影响[J]. 中国修复重建外科杂志,2007,10(21):1040-1044.

(收稿日期:2008-11-06)

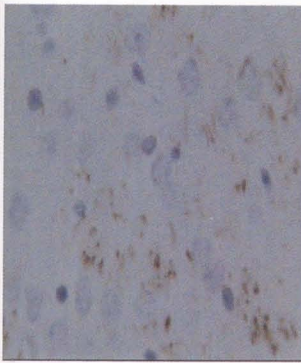


图1.1 模型组仔鼠脑NFP表达
(ABC法, 400×)

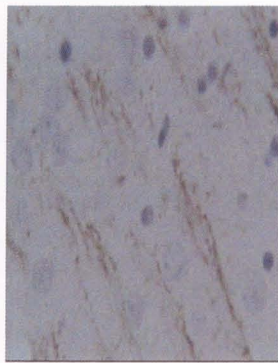


图1.2 对照组仔鼠脑NFP表达
(ABC法, 400×)

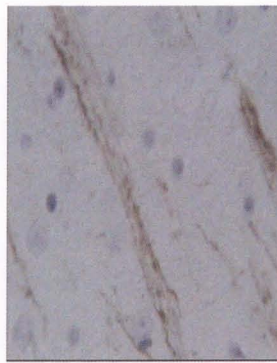


图1.3 针刺组仔鼠脑NFP表达
(ABC法, 400×)

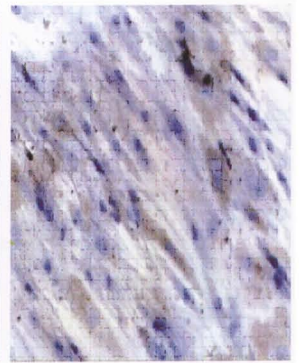


图2.1 正常CMs上清
(cTnl染色200×)

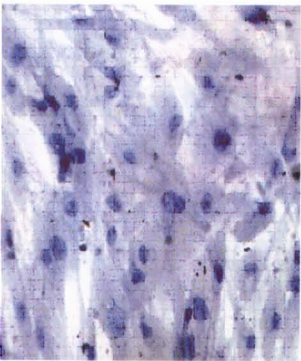


图2.2 正常CMs上清
(Desmin染色, 200×)



图2.3 损伤CMs上清
(cTnl染色, 200×)



图2.4 损伤CMs上清
(Desmin染色, 200×)

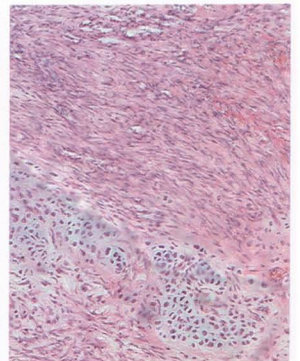


图3.1 骨折-脑外伤组1周
(HE染色, 100×)

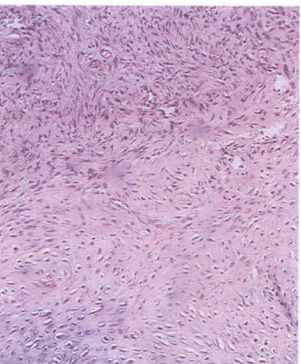


图3.2 单纯骨折组1周
(HE染色, 100×)

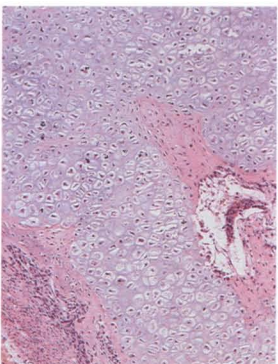


图3.3 骨折-脑外伤组2周
(HE染色, 100×)

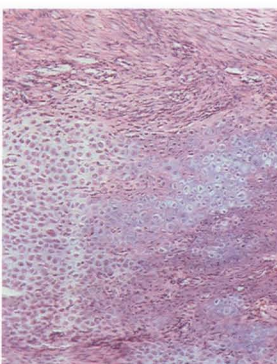


图3.4 单纯骨折组2周
(HE染色, 100×)

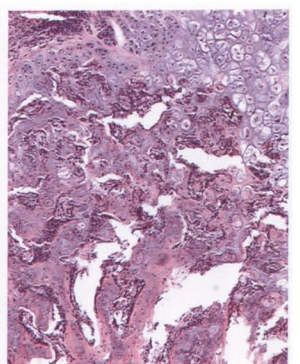


图3.5 骨折-脑外伤组3周
(HE染色, 100×)

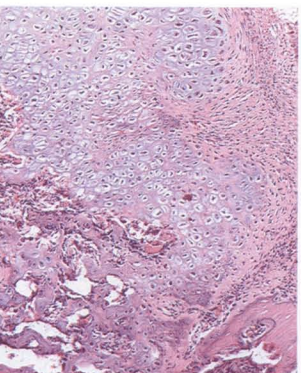


图3.6 单纯骨折组3周
(HE染色, 100×)

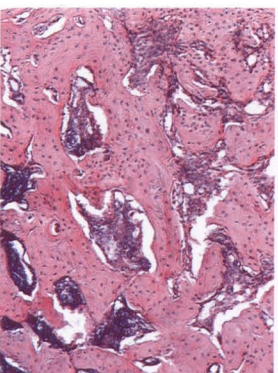


图3.7 骨折-脑外伤组4周
(HE染色, 100×)

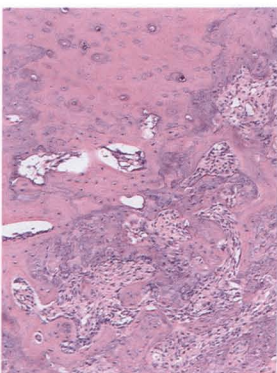


图3.8 单纯骨折组4周
(HE染色, 100×)

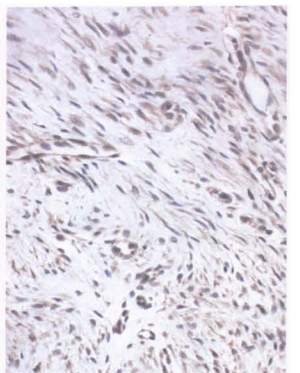


图3.9 骨折-脑外伤组1周
(免疫组织化学染色, 200×)

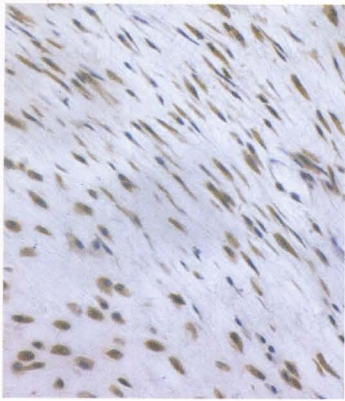


图3.10 单纯骨折组1周
(免疫组织化学染色, 200×)

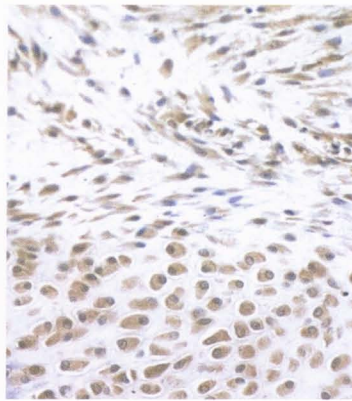


图3.11 骨折-脑外伤组2周
(免疫组织化学染色, 200×)

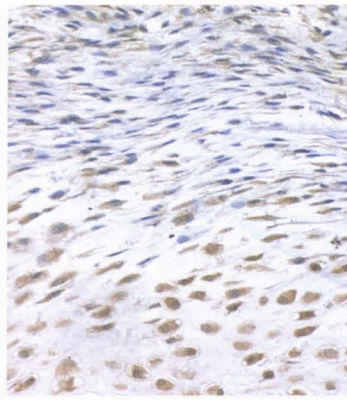


图3.12 单纯骨折组2周
(免疫组织化学染色, 200×)

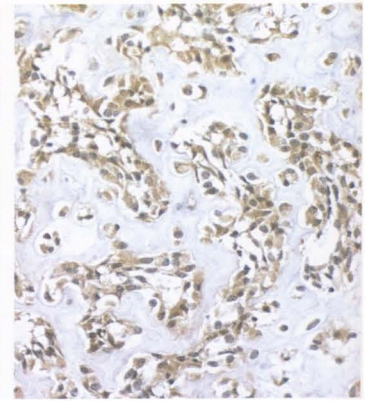


图3.13 骨折-脑外伤组3周
(免疫组织化学染色, 200×)

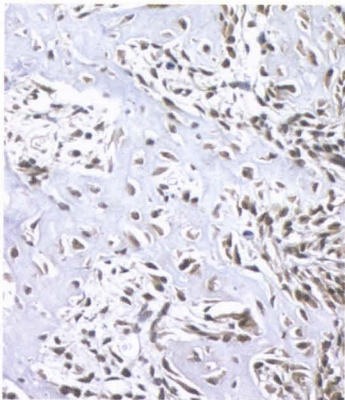


图3.14 单纯骨折组3周
(免疫组织化学染色, 200×)

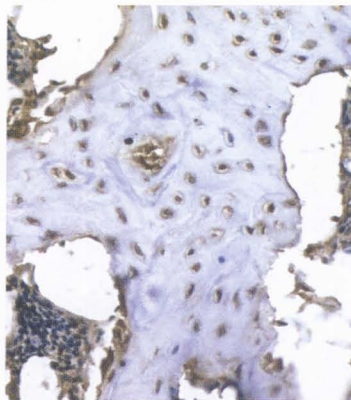


图3.15 骨折-脑外伤组4周
(免疫组织化学染色, 200×)

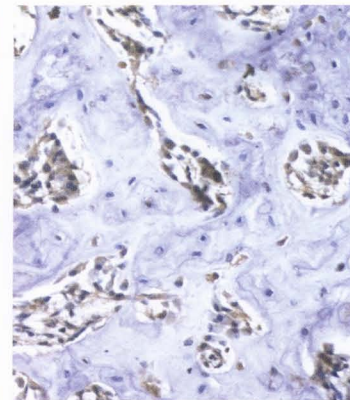


图3.16 单纯骨折组4周
(免疫组织化学染色, 200×)

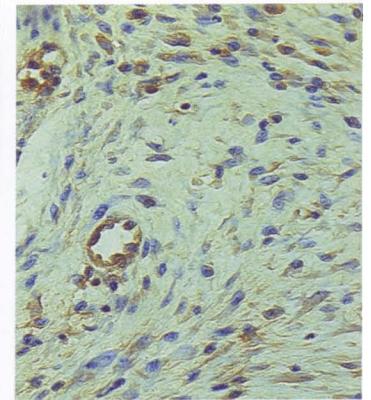


图3.17 骨折-脑外伤组1周
(原位杂交染色, 200×)

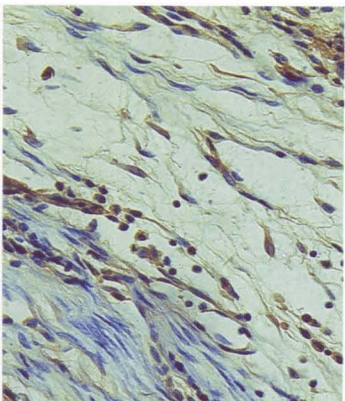


图3.18 单纯骨折组1周
(原位杂交染色, 200×)

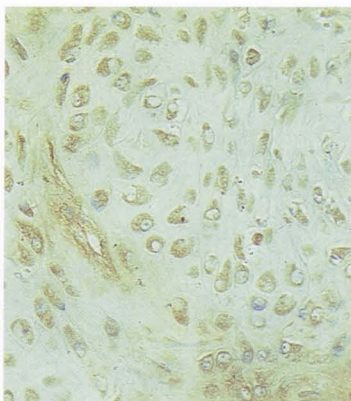


图3.19 骨折-脑外伤组2周
(原位杂交染色, 200×)

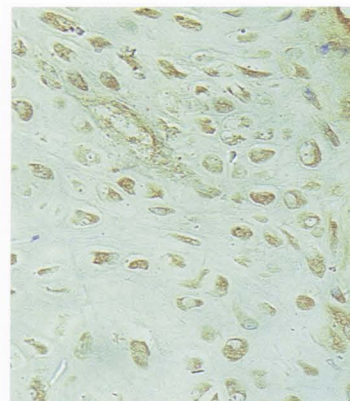


图3.20 单纯骨折组2周
(原位杂交染色, 200×)

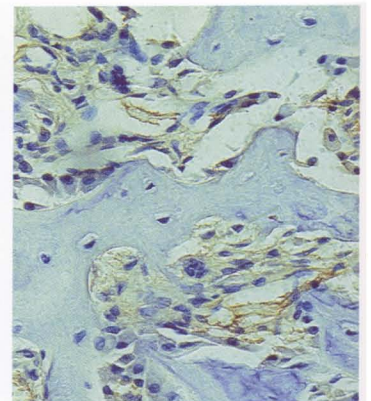


图3.21 骨折-脑外伤组3周
(原位杂交染色, 200×)

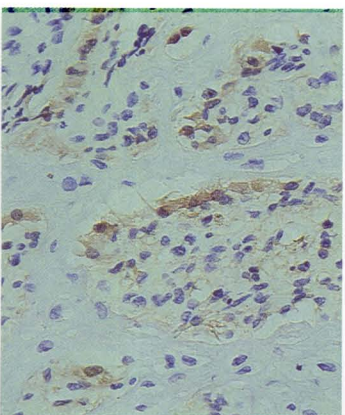


图3.22 单纯骨折组3周
(原位杂交染色, 200×)

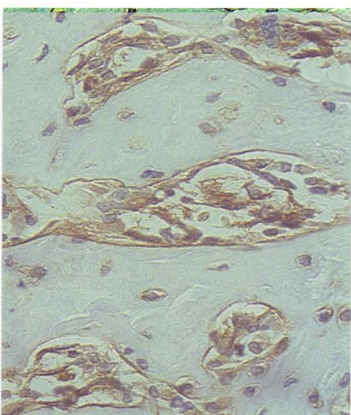


图3.23 骨折-脑外伤组4周
(原位杂交染色, 200×)

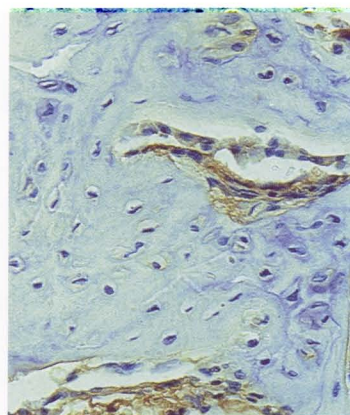


图3.24 单纯骨折组4周
(原位杂交染色, 200×)

图1.1~1.3正文见P207;
图2.1~2.4 正文见P229;
图3.1~3.24 正文见P234。