

# 神经生长因子对失神经状态下大鼠骨折愈合的影响

马 骋, 苟三怀\*, 肖海军, 欧阳跃平, 刘 岩, 何 仿

(第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003)

**[摘要]** **目的:**探讨神经生长因子(NGF)对脊髓完全横断伴胫骨骨折大鼠骨折愈合的影响。**方法:**120只SD大鼠随机分成3组:胫骨骨折组(F组,  $n=40$ ),  $T_{10}$ 脊髓完全性损伤合并胫骨骨折组(FS组,  $n=40$ ),  $T_{10}$ 脊髓完全性损伤合并胫骨骨折应用神经生长因子治疗组(FSN组,  $n=40$ )。FS组及FSN组大鼠建立  $T_{10}$  脊髓完全横断伴胫骨骨折模型, F组制备单纯胫骨骨折, 伤后第4周对3组大鼠骨折断端行断层CT扫描, 测量骨折断端最大横截面并计算骨痂灰度值; 行生物力学三点弯曲试验; 行骨组织形态计量学检查; 骨密度测定; 骨痂组织形态学观察; 免疫组化法测定骨痂组织中骨钙素(OCN)的表达; 观察3组大鼠骨痂中成骨细胞的超微结构变化; Western印迹检测I、II型胶原的表达。**结果:**F组骨痂断面最大直径明显小于FS组( $P<0.01$ )和FSN组( $P<0.05$ ), FSN组小于FS组( $P<0.05$ ); 骨痂灰度值结果类似。三点折弯试验、骨计量学观察均发现F组各项生物力学参数优于其他2组( $P<0.05$ ); FSN组优于FS组( $P<0.05$ )。F组大鼠胫骨骨痂中OCN及I型胶原蛋白表达明显高于其他2组( $P<0.05$ ), FSN组高于FS组( $P<0.05$ ); 而F组骨痂II型胶原蛋白的表达明显低于FS组及FSN( $P<0.05$ ), FSN组亦高于FS组( $P<0.05$ )。形态学及超微结构观察见F组骨折愈合最佳, FSN组优于FS组。**结论:**失神经营养会影响骨折断端的骨化; 神经生长因子对失神经状态下骨折断端的骨化有促进作用。

**[关键词]** 神经生长因子; 脊髓损伤; 骨折愈合

**[中图分类号]** R 683 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)05-0474-06

## Effect of nerve growth factor on denervated bone fracture healing in rats

MA Cheng, GOU San-huai\*, XIAO Hai-jun, OUYANG Yue-ping, LIU Yan, HE Fang (Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the effect of nerve growth factor (NGF) on bone fracture healing of inflicted  $T_{10}$  spinal cord injury (SCI) complicated with tibia fracture in rats. **Methods:** Totally 120 rats were randomly divided into tibia fracture group (F group,  $n=40$ ),  $T_{10}$  SCI + tibia fracture group (FS group,  $n=40$ ), and  $T_{10}$  SCI + tibia fracture + NGF group (FSN group,  $n=40$ ). Four weeks later, the fracture sites in the 3 groups were subjected to CT scanning; the maximum transverse diameter of the fracture ends and the gray scales of non-osseous area were measured; the changes of biomechanics property of the fracture ends were determined by three-point bending test; the bone morphometry, bone density, and histomorphology of callus were determined; the expression of OCN was detected by immunohistochemical method; the osteoblast ultrastructure was observed by TEM and the expression of I, II type collagen were examined by Western blotting. **Results:** The maximum transverse diameter of F group was less than those of FS group ( $P<0.01$ ) and FSN group ( $P<0.05$ ), and FS group was longer than FSN group ( $P<0.05$ ); the comparison of gray scales among 3 groups had a similar result to that of the section diameter. Three points bending test and bone morphometry test showed that the biomechanics property of the fracture ends in F group were better than those of the other 2 groups ( $P<0.05$ ), and FSN group was better than FS group ( $P<0.05$ ). The expression of OCN and type I collagen in the callus of F group was significantly higher than that of the other 2 groups ( $P<0.05$ ), and FSN group was higher than FS group ( $P<0.05$ ); while the expression of type II collagen in F group was lower than that of the other 2 groups ( $P<0.05$ ), and FSN group was higher than FS group ( $P<0.05$ ). Morphological and ultrastructure observation showed that fracture in F group had the best healing result, and the healing result of FSN group was better than that of the FS group. **Conclusion:** It is suggested that denervation can affect the ossification of fracture ends and NGF can promote the ossification of fracture ends suffering denervation.

**[KEY WORDS]** nerve growth factor; spinal cord injuries; fracture healing

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(5): 474-479]

临床实践中常常会发现, 截瘫和颅脑损伤患者伴随有四肢骨折时, 往往在骨折断端可见到大量不成熟的骨痂生长, 甚至肌肉内可以出现异位骨化<sup>[1]</sup>。但是这种骨痂强度差, 编织骨向板层骨转化慢, 因此

认为神经系统参与了骨折愈合过程, 推测神经系统

**[作者简介]** 马 骋, 博士, 主治医师。现在吉林省北华大学附属医院骨科, 吉林 132001. E-mail: macheng0626@126.com

\* Corresponding author. E-mail: gousanhui@yahoo.com

最终与骨生成和骨转化有关。已有研究<sup>[2]</sup>表明神经生长因子(NGF)可促进骨折愈合,但相关研究均集中在单纯骨折,其对失神经状态下骨折愈合的影响鲜有报道。本实验将 NGF 进一步应用于失神经状态下骨折大鼠,探讨 NGF 对失神经状态下骨折愈合的影响。

## 1 材料和方法

1.1 动物分组及处理 健康雄性 3 个月龄 SD 大鼠 120 只(中国科学院上海实验动物中心),体质量 250~300 g,随机分为 3 组:单纯左胫骨骨折组(F 组);T<sub>10</sub>脊髓完全性损伤+左胫骨骨折组(FS 组);T<sub>10</sub>脊髓完全性损伤+左胫骨骨折+NGF 治疗组(FSN),每组 40 只。

胫骨骨折的制备<sup>[3-4]</sup>:浓度为 100 g/L 水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,折断胫骨上 1/3 处,平台前缘插入克氏针行髓内固定,术后石膏固定;T<sub>10</sub>脊髓横断:背部正中切口,显露并横断 T<sub>10</sub>段脊髓,切除约 0.3 cm;F 组不损伤脊髓。术后脊髓损伤组保温,每隔 6 h 给大鼠挤尿 1 次,术后 3~5 d 内肌注青霉素(50 mg/kg)。

NGF 的配制及应用:将每瓶 6 000 U 包装的 NGF 冻干粉(注射用 NGF,厦门北大之路生物工程有限公司,实验用药)用 1 ml 生理盐水充分稀释,参照文献<sup>[3]</sup>剂量,肌注 2 000 AU(1.4 μg),1 次/d,分别注射两侧腓肠肌,连续肌注 2 周。骨折后 4 周处死动物取组织标本进行观察。

1.2 骨折断端横截面最大直径及断面骨痂灰度值的测定 于骨折断端骨痂量最多处行薄层 CT 扫描,图像经数字化处理,计算其横截面最大直径;同时用 PEAT 软件定位软骨性骨痂的灰度区,计算相同灰度区面积,进行组间比较,对比分析骨痂中软骨灰度区面积的大小。

1.3 生物力学三点弯曲试验 取大鼠胫骨进行三点弯曲试验测定断裂能量、大鼠胫骨的比挠度 λ、大鼠胫骨愈合时的相关力学性能参数、大鼠胫骨的愈合强度、大鼠胫骨的愈合刚度。

1.4 骨组织计量学的比较 处死前 9 d 和 2 d 用盐酸四环素(购于 Sigma 公司)30 mg/kg 皮下注射。标本先后经固定、脱水、包埋剂的配制、制作包埋瓶底、浸润、制作包埋瓶底、制片、切片的干燥、脱塑料包埋、染色。行组织学观察和荧光动态参数、静态参

数的测定。采用 Nikon Spot 图像采集系统采图,测定静态参数、动态参数。

1.5 骨痂组织形态学观察 以骨折处为中心取 1 cm 长大鼠胫骨固定于 4% 多聚甲醛,EDTA 溶液中脱钙,乙醇逐级脱水。石蜡包埋,制成切片,H-E 染色观察骨痂中成骨细胞形态。

1.6 骨钙素(OCN)的免疫组化表达 标本同 1.5, H-E 染色,参照试剂盒(Vector 公司)要求行 ABC 免疫组化,具体步骤:石蜡切片常规脱蜡至水,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 灭活内源性过氧化物酶,0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,10% 正常马血清封闭,加入 OCN 单克隆抗体(Sigma 公司),4℃ 孵育过夜,PBS 清洗后加羊抗鼠二抗(Vector)公司,37℃ 1 h 后 PBS 清洗,加入 ABC 过氧化物酶复合物室温作用 1 h,然后 DAB 显色,苏木精复染。

1.7 骨痂成骨细胞超微结构的观察 将新鲜骨痂尽可能锯成 1~2 mm<sup>3</sup> 大小放入脱钙液中,直到用针头可刺透标本,送上海交通大学医学院电镜室制片观察。

1.8 Western 印迹检测骨痂中 I、II 型胶原蛋白的表达 标本脱钙 1 周,取脱钙骨组织按组织裂解法提取蛋白;Bradford 法测定蛋白浓度<sup>[6]</sup>,上样量 60 μg,用夹心法把滤纸、凝胶、硝酸纤维素膜,依顺序放好,插入电转移槽中,并加入电转移缓冲液,100 V 电压下转膜 100 min。取出硝酸纤维素膜置入 2% BSA/PBST 液中 37℃ 封闭 2 h,加入 I 型胶原的一抗(1:1 500),4℃ 冰箱过夜,次日漂洗硝酸纤维素膜 3 次,再加入二抗(1:2 000),室温 2 h,取出再次漂洗 3 次,用 ECL RegentA/RegentB(1:1)混匀后涂抹于硝酸纤维素薄膜上,反应 5 min;用塑料保鲜膜包裹后固定于压片匣中,曝光显影。将 X 线胶片置于 Gel Doc2000 图像分析系统,测定目的条带波长为 562 nm 的平均光密度值(D),并将 5 次实验结果的平均值作为蛋白含量的相对值。采用生物电泳图像处理系统对免疫复合物进行分析<sup>[7]</sup>,以各组产物光密度值与 β-actin 光密度值的比值作为各组产物相对光密度值。II 型胶原测定方法同 I 型胶原。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 10.0 for Windows 统计学软件,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 骨折断端横截面最大直径及断面骨痂灰度

值 术后4周取标本,行薄层CT检查(图1)并测量骨痂断面最大直径,F组、FS组、FSN组分别为(4.09±0.73)、(4.48±0.76)、(4.23±0.69) mm;组间分析结果表明,FS组明显高于F组( $P < 0.01$ ),也高于FSN组( $P < 0.05$ ),FSN组高于F组

( $P < 0.05$ )。3组的骨痂灰度值分别为1.24±0.03、2.01±0.05、1.64±0.04,组间分析结果表明,FS组明显高于F组( $P < 0.01$ ),也高于FSN组( $P < 0.05$ ),FSN组高于F组( $P < 0.05$ )。详见图1。

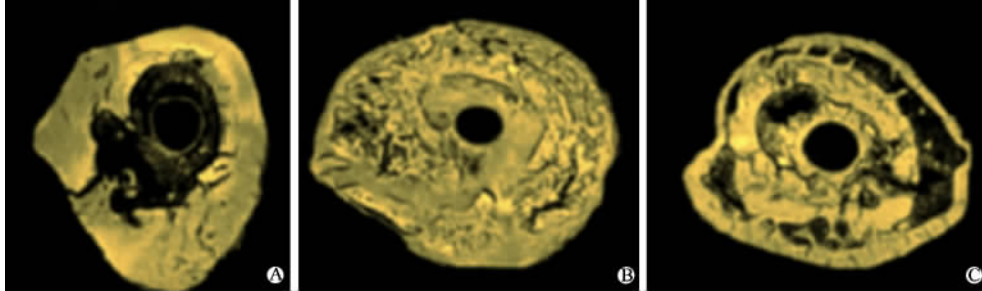


图1 3组大鼠胫骨骨折断端横截面最大直径及断面的骨痂形成比较

Fig 1 Comparison of maximum transverse diameter of fracture end and callus among the 3 groups

A: F group; B: FS group; C: FSN group

2.2 生物力学的三点弯曲试验结果 通过3组大鼠胫骨的三点弯曲试验,得到大鼠胫骨愈合过程中弯曲力学性能试验结果(表1)。结果表明,F组在弯曲强度及弯曲刚度等各项生物力学三点弯曲试验中

均优于其他2组,统计学显示有显著性差异( $P < 0.05$ );FSN组大鼠胫骨骨折断端的弯曲刚度、弯曲强度、弯曲挠度、弯曲载荷、弯矩及比挠度λ等6项指标均优于FS组,有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表1 大鼠胫骨弯曲力学性能参数值  
Tab 1 Rat tibia bend mechanics parameters

Group	n	Bending load (N)	Bending moment (N·mm)	Bending flexibility (mm)	Contrast flexibility ( $\times 10^{-2}$ )	Bending strength (MPa)	Bending rigidity ( $\times 10^4, N \cdot mm / Deg$ )
F	8	109.10±7.64	722.79±54.20	0.24±0.02	0.91±0.06	150.20±11.41	1.60±0.12
FS	9	84.50±5.49*	552.42±31.35*	0.20±0.01*	0.76±0.05*	120.50±7.84*	1.37±0.09*
FSN	8	103.10±7.01*△	701.08±47.67*△	0.23±0.01	0.85±0.06*△	147.14±10.10*△	1.58±0.11*△

\*  $P < 0.05$  vs F group; △  $P < 0.05$  vs FS group

2.3 骨组织计量学的比较 结果表明,F组胫骨断端骨计量学静力学参数优于其他2组,统计学显示有显著性差异( $P < 0.05$ );FSN组优于FS组,有统计学意义( $P < 0.05$ )。F组大鼠胫骨骨痂骨计量动力学参数优于其他2组,统计学显示有显著性差异( $P < 0.05$ );FSN组优于FS组,有统计学意义( $P < 0.05$ )。详见表2、表3、图2。

2.4 骨痂组织形态学的观察 F组有较多的软骨痂和骨痂形成,以编织骨为主,编织骨多且粗,编织骨边缘可见大量的成骨细胞,编织骨内可见到较多

的骨细胞,骨细胞边缘有陷窝,陷窝深,偶见破骨细胞,编织骨内可以见到钙盐线,钙盐线粗大,色深;FS组仍可见大量纤维骨痂,软骨团多见,其内有少许编织骨形成,编织骨较为纤细,边缘可以见到成骨细胞,但是数量不多,编织骨内骨细胞少,看不到破骨细胞,钙盐线不清晰;FSN组纤维骨痂与骨痂各半,编织骨比较粗大,可以见到成骨细胞在骨痂的边缘,但骨细胞数量不多,骨陷窝不深,未见破骨细胞,编织骨内可见钙盐线,钙盐线比较粗,色浅。详见图3。

表 2 大鼠胫骨断端骨计量学静力学参数

Tab 2 Histomorphometry static parameters of rat tibia fracture ends

(n=19,  $\bar{x} \pm s$ )

Parameter	F group	FS group	FSN group
Average width of mineralized callus( $b/\mu\text{m}$ )	28.18±2.91	20.88±2.10*	27.19±2.81* $\Delta$
Area of mineralized callus( $A/\mu\text{m}^2$ )	2 583.48±381.21	2 008.18±267.10*	2 489.10±245.56* $\Delta$
Active absorption surface(%)	4.12±0.87	4.38±0.16*	4.27±0.49* $\Delta$
Osteoid(%)	49.67±0.47	43.11±0.42*	44.11±0.43* $\Delta$
Osteoclast index number	3.59±0.83	1.72±0.65*	3.09±0.23* $\Delta$
Osteoblast index number	27.58±2.18	20.54±4.16*	24.89±4.11* $\Delta$
Osteoid average width( $b/\mu\text{m}$ )	3.12±0.17	2.99±0.19*	3.56±0.20* $\Delta$
Mineralization surface ratio(%)	58.16±5.14	43.35±4.77*	52.09±4.61* $\Delta$

\*  $P < 0.05$  vs F group;  $\Delta P < 0.05$  vs FS group

表 3 大鼠胫骨骨痂骨计量动力学参数

Tab 3 Histomorphometry dynamic parameters of rat tibia fracture ends

( $\bar{x} \pm s$ )

Parameter	F group(n=21)	FS group(n=22)	FSN group(n=22)
Bone mineralization sedimentation rate	0.754±0.063	0.975±0.177*	0.708±0.078* $\Delta$
Osteoblast activity	5.786±0.987	3.134±0.654*	4.897±0.453* $\Delta$
Bone absorption rate(%)	17.436±8.435	23.782±9.101*	19.564±9.567* $\Delta$
Bone resorption periodicity( $t/\text{month}$ )	1.568±0.100	0.935±0.067*	1.076±0.989* $\Delta$
Osteoclast activity	145.99 ±88.12	126.09 ±54.00	139.99 ±64.67

\*  $P < 0.05$  vs F group;  $\Delta P < 0.05$  vs FS group

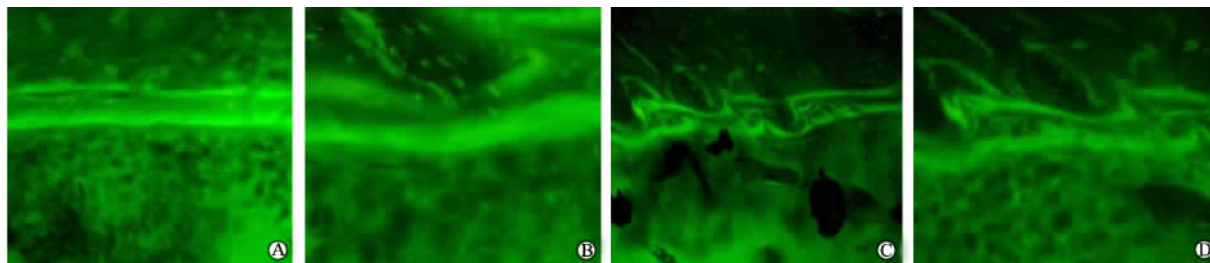


图 2 骨组织形态计量学的比较

Fig 2 Comparison of bone morphometry test

A: Normal bone; B: F group; C: FSN group; D: FS group

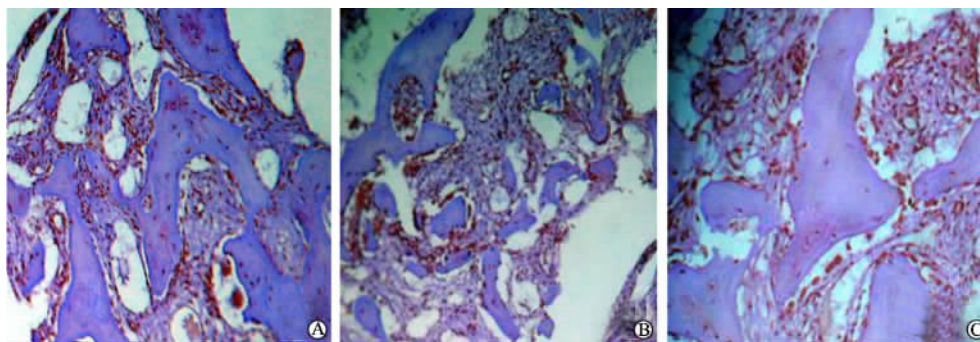


图 3 大鼠胫骨骨折断端第 4 周骨痂的组织形态学

Fig 3 Histomorphology of callus 4 weeks after tibia fracture in rats (H-E, X200)

A: F group; B: FS group; C: FSN group

2.5 骨痂中 OCN 的表达 大鼠胫骨骨痂中 OCN 免疫组化可见,成骨细胞及骨陷窝里的骨细胞均可见阳性表达,F 组 OCN 表达明显高于其他 2 组

( $P < 0.05$ ),阳性染色呈深褐色表达;FSN 组 OCN 表达显著高于 FS 组( $P < 0.05$ )。详见图 4。

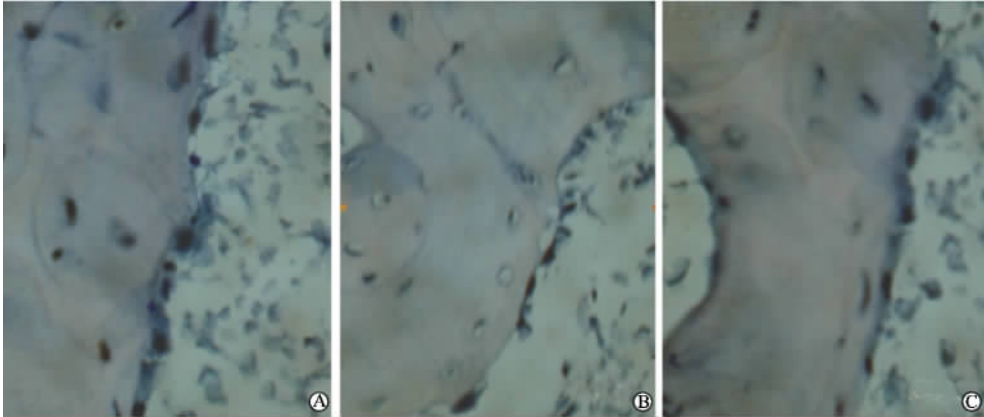


图 4 骨折后 4 周骨痂 OCN 免疫组化表达

Fig 4 Expression of OCN immunohistochemistry 4 weeks after fracture(ABC,  $\times 200$ )

A: F group; B: FS group; C: FSN group

2.6 骨痂中成骨细胞的超微结构 透射电镜下见 3 种骨痂中成骨细胞有明显不同;细胞的形态上,F 组的成骨细胞呈突起显著,细胞边缘不光滑,皱折明显;FS 组细胞突起少,细胞边缘平整;FSN 组的细胞突起细长,细胞边缘略有皱折。细胞内的细胞器主要表现在粗面内质网数量及形态上有不同,F 组粗

面内质网粗大,扩张明显,同时线粒体发达;FS 组粗面内质网无明显扩张,不发达,还可以见到数量较多溶酶体;FSN 组粗面内质网形态介于以上 2 组之间,粗面内质网扩张,并可见到数量较多的高尔基体。详见图 5。

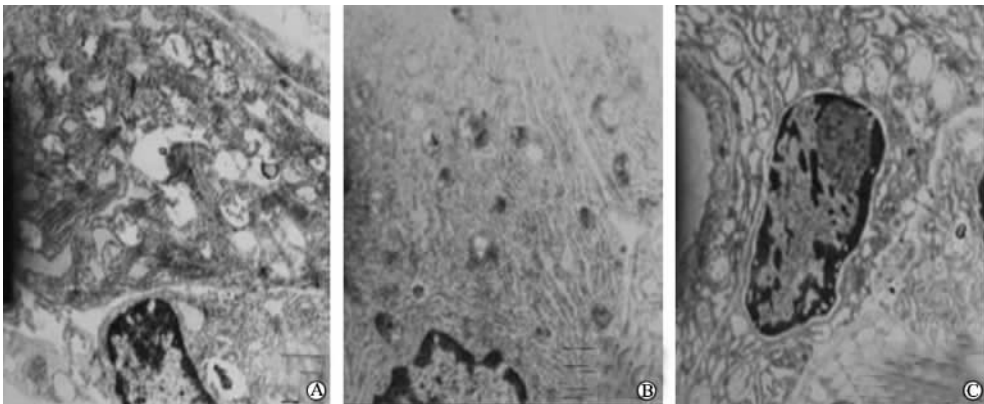


图 5 骨痂中成骨细胞的超微结构

Fig 5 Osteoblast ultrastructure under TEM of callus in 3 groups( $\times 400$ )

A: F group; B: FS group; C: FSN group

2.7 骨痂中 I 型、II 型胶原蛋白的表达 见图 6。伤后 4 周 FS 组 I 型胶原蛋白表达的相对光密度值为  $0.705 \pm 0.331$ ,明显低于 F 组的  $0.787 \pm 0.254$  ( $P < 0.01$ );FSN 组 I 型胶原蛋白表达的相对光密度值为  $0.776 \pm 0.282$ ,亦明显高于 FS 组 ( $P <$

$0.05$ ),但明显低于 F 组( $P < 0.05$ );FS 组骨痂中 II 型胶原蛋白的表达的相对光密度值为  $0.903 \pm 0.308$ ,明显高于 F 组的  $0.897 \pm 0.394$  ( $P < 0.05$ ),但明显低于 FSN 组的  $1.212 \pm 0.705$  ( $P < 0.05$ ),FSN 组亦高于 F 组( $P < 0.05$ )。



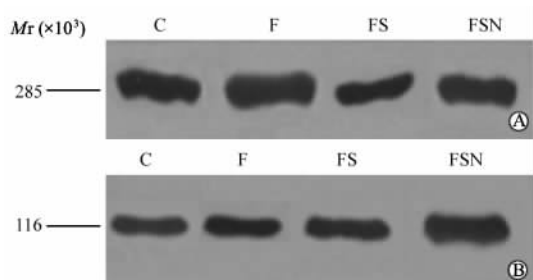


图6 伤后4周I型(A)、II型(B)胶原的表达  
Fig 6 Western blot analysis of collagen type I (A)  
and type II (B) 4 weeks after fracture  
C: Standard collagen protein

### 3 讨论

临床中发现失神经可导致骨折断端骨痂过度生长甚至在肌肉中出现异位骨化<sup>[7]</sup>,这一现象提示神经因素对骨折愈合有一定影响。近年来,神经对骨折愈合影响的研究逐渐成为临床医师及科研人员关注的重点<sup>[8]</sup>。

本实验采用的CT断层扫描方法较普通X线片更客观地反映骨折断端骨痂量及愈合情况。研究结果表明失神经状态下骨折愈合第4周骨痂中I型胶原分泌减少,骨痂仍停留在II型胶原未吸收的状态,这是导致骨折断端虽然有大量的骨痂生长而骨痂的力学强度差的原因。其可能机制是:一方面骨折初始靶细胞因失去神经因素的调控而分泌大量的神经营养因子来诱使神经纤维长入到失神经的骨折区;另一方面这些神经营养因子与骨系细胞上的受体结合通过磷酸化增强了骨系细胞的活性及功能活动<sup>[9]</sup>,表现为分泌更多的细胞外基质如II型胶原。随着机体对失神经状态的逐渐适应,失神经状态对靶细胞的应激作用趋于缓和,靶细胞与靶组织分泌的神经营养因子也渐渐减少<sup>[10]</sup>,最终因失去神经调控出现了低于正常状态下的分泌量。而此时正值骨折断端愈合过程中由类骨质向骨性骨痂转化期,成骨细胞失去了正常神经因素的调控作用,无法分泌更多的I型胶原为类骨质骨化提供基础,最终骨折断端表现为大量的骨痂生长而骨痂骨化困难。这与Grills等<sup>[11]</sup>于1998年提出神经元与靶细胞之间的相互依赖学说相一致。应用NGF治疗失神经状态下的骨折不仅早期可促II型胶原分泌,而且在骨折愈合的第4周为成骨细胞提供更多的I型胶原,间

接地促进了骨痂骨化,但其具体调控机制还有待进一步研究。

最近研究<sup>[12]</sup>发现骨不连及异位骨化的骨组织中少有或没有神经纤维长入,推测神经因素可能对骨折后产生骨不连等不良预后有一定影响。本实验结果证实神经因素对骨折愈合有明显影响,神经生长因子对失神经状态下骨折愈合有一定促进作用,可能为治疗骨不连及异位骨化提供了新的方法及思路。

### [参考文献]

- [1] 姚建华,时述山,李亚非. 脊髓损伤伴骨折大鼠血清中降钙素基因相关肽的变化[J]. 中华创伤杂志,2000,16:538-540.
- [2] Grills B L, Schuijers J A, Ward A R. Topical application of nerve growth factor improves fracture healing in rats [J]. J Orthop Res, 1997, 15: 235-242.
- [3] Sakai R, Miwa K, Eto Y. Local administration of activin promotes fracture healing in the rat fibula fracture model [J]. Bone, 1999, 25: 191-196.
- [4] 费琴明,陈统一,陈中伟. 大鼠胫骨标准骨折模型的制作 [J]. 上海实验动物科学, 2002, 22: 10-12.
- [5] Dooley P C, Howgate M L, Schuijers J A, et al. Early callus of fractured rib of rat contracts and relaxes *ex vivo* [J]. J Orthop Res, 2004, 22: 1063-1071.
- [6] 奥斯伯 F M. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 332-333.
- [7] Spencer R F. The effect of head injury on fracture healing. A quantitative assessment [J]. J Bone Joint Surg Br, 1987, 69: 525-528.
- [8] Jehan F, Naveilhan P, Neveu I, et al. Regulation of NGF, BDNF and LINGFR gene expression in ROS 17/2. 8 cells [J]. Mol Cell Endocrinol, 1996, 116: 149-156.
- [9] Obrant K J, Ivaska K K, Gerdhem P, et al. Biochemical markers of bone turnover are influenced by recently sustained fracture [J]. Bone, 2005, 36: 786-792.
- [10] Dobnig H, Sipos A, Jiang Y, et al. Early changes in biochemical markers of bone formation correlate with improvements in bone structure during teriparatide therapy [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90: 3970-3977.
- [11] Grills B L, Schuijers J A. Immunohistochemical localization of nerve growth factor in fractured and unfractured rat bone [J]. Acta Orthop Scand, 1998, 69: 415-419.
- [12] Wang L, Zhou S, Liu B, et al. Locally applied nerve growth factor enhances bone consolidation in a rabbit model of mandibular distraction osteogenesis [J]. J Orthop Res, 2006, 24: 2238-2245.

[收稿日期] 2006-12-10

[修回日期] 2007-02-05

[本文编辑] 贾泽军