

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.09.008

肌注神经生长因子及血小板衍生生长因子对胫骨干闭合骨折大鼠早期骨愈合的影响及机制探究*

刘超 徐飞 范新 杨浩 王蒲春

(西安交通大学医学院附属三二〇一医院急诊科 陕西 汉中 723000)

摘要 目的:探讨肌肉注射神经生长因子(NGF)和血小板衍生生长因子(PDGF)对胫骨干闭合骨折大鼠早期骨愈合的效果及潜在机制。**方法:**采用随机数字表法将 80 只健康成年雄性 SD 大鼠分为模型组、NGF 组、PDGF 组和 NGF+PDGF 组,各 20 只。建立胫骨干闭合骨折模型后,给予 NGF 组大鼠肌注 0.8 μ g NGF;给予 PDGF 组大鼠肌注 0.8 μ g PDGF,给予 NGF+PDGF 组大鼠肌注 0.8 μ g NGF 和 0.8 μ g PDGF;给予模型组大鼠肌注等体积生理盐水。分别在治疗第 2 周(T_0)、第 4 周(T_1)、第 6 周(T_2)通过 X 线检查计算骨痂体积,采用酶联免疫吸附法检测血清中碱性磷酸酶(AKP)水平。颈椎脱臼法处死大鼠后采用苏木精-伊红(HE)染色观察胫骨骨折端病理学改变,采用实时荧光定量 PCR 法检测骨痂组织骨形态发生蛋白 2(BMP2)、血管内皮生长因子(VEGF)和胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)mRNA 相对表达水平。**结果:**NGF+PDGF 组大鼠在 T_1 时骨折断端愈合,骨痂体积大于其他三组;NGF 组、PDGF 组大鼠在 T_2 时骨折断端愈合,骨痂体积大小均大于模型组($P<0.05$)。模型组大鼠 T_2 时骨折断端尚未完全愈合,骨痂体积显著大于其他三组($P<0.05$)。NGF+PDGF 组大鼠 T_0 ~ T_1 时血清 AKP 水平均显著高于其他三组,NGF 组和 PDGF 组大鼠血清 AKP 水平显著高于模型组($P<0.05$)。 T_2 时 4 组大鼠血清 AKP 水平比较无显著差异($P>0.05$)。 T_1 时,NGF 组、PDGF 组和 NGF+PDGF 组大鼠均可见骨小梁形态更加粗大、致密,呈栅栏状排列,骨小梁间的间隙变小,NGF+PDGF 组大鼠骨折断端处被新生骨填满,NGF 组、PDGF 组骨折断端处仍有少量间隙。 T_1 时 NGF+PDGF 组大鼠 BMP2、VEGF 和 IGF-1 相对表达水平均显著高于其他三组($P<0.05$),NGF 组和 PDGF 组大鼠各指标 mRNA 相对表达水平比较无显著差异($P>0.05$),但均显著高于模型组($P<0.05$)。 T_2 时各组大鼠骨痂组织中 BMP2、VEGF 和 IGF-1 mRNA 相对表达水平比较无显著差异($P>0.05$)。**结论:**NGF 和 PDGF 对胫骨干闭合骨折大鼠早期骨愈合有协同促进作用,可能与促进 BMP2、VEGF 和 IGF-1 表达上调有关。

关键词:神经生长因子;血小板衍生生长因子;胫骨干闭合骨折;骨愈合

中图分类号:R-33;R683;R456 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)09-1642-05

Effect of Intramuscular Injection of Nerve Growth Factor and Platelet-derived Growth Factor on Early Bone Healing in Rats with Closed Tibial Shaft Fracture and Its Mechanism*

LIU Chao, XU Fei, FAN Xin, YANG Hao, WANG Pu-chun

(Department of Emergency, Xi'an Jiaotong University School of Medicine Affiliated 3201 Hospital, Hanzhong, Shaanxi, 723000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect and potential mechanism of intramuscular injection of nerve growth factor (NGF) and platelet derived growth factor (PDGF) on early bone healing in rats with closed tibial shaft fractures. **Methods:** Eighty healthy adult male SD rats were randomly divided into model group, NGF group, PDGF group and NGF+PDGF group with 20 rats each. After establishing the model of closed tibial shaft fracture, rats in NGF group were given intramuscular injection of 0.8 μ g NGF. Rats in PDGF group received intramuscular injection of 0.8 μ g PDGF, the rats in NGF+PDGF group were intramuscularly injected with 0.8 μ g NGF and 0.8 μ g PDGF; The rats in the control group and model group were given intramuscular injection of physiological saline of the same volume. The callus volume was calculated by X-ray examination at the 2nd week (T_0), 4th week (T_1) and 6th week (T_2) of treatment, and the serum alkaline phosphatase (AKP) level was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. After the rats were killed by cervical dislocation method, Hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of tibial fracture end, and real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect bone morphogenetic protein 2 (BMP2) Relative expression level of vascular endothelial growth factor (VEGF) and insulin like growth factor-1 (IGF-1) mRNA. **Results:** In NGF+PDGF group, the fracture ends healed at T_1 , and the callus volume was larger than the other three groups; The fracture ends of NGF group and PDGF group healed at T_2 , and the volume of callus was larger than that of model group ($P<0.05$). The fracture ends of the model group were not fully healed at T_2 , and the callus volume was larger than that of the other three groups ($P<0.05$). The serum AKP levels of NGF+PDGF group rats were higher than those of the other three groups at T_0 ~ T_1 , and the serum AKP levels of NGF group and PDGF group rats were higher than those of the model

* 基金项目:2017 年度陕西省卫生计生委科技基金项目(2017SF-228)

作者简介:刘超(1978-),男,本科,主治医师,研究方向:创伤骨科,E-mail:liuchao197806@163.com

(收稿日期:2022-11-07 接受日期:2022-11-30)

group ($P < 0.05$). There was no significant difference in serum AKP level among the four groups at T_2 ($P > 0.05$). At T_1 , the bone trabeculae of rats in NGF group, PDGF group and NGF+PDGF group were thicker, denser, and arranged in a palisade shape. The space between bone trabeculae became smaller. The bone fracture of rats in NGF+PDGF group was filled with new bone, and there was still a small amount of space in the bone fracture of NGF group and PDGF group. At T_1 , the relative expression level of NGF+PDGF group rats was higher than that of the other three groups ($P < 0.05$). There was no difference between NGF group and PDGF group in the relative expression level of mRNA of each index ($P > 0.05$), but they were higher than that of the model group ($P < 0.05$). At T_2 , there was no difference in the relative expression levels of BMP2, VEGF and IGF-1 mRNA in the callus tissues of rats in each group ($P > 0.05$).

Conclusion: NGF and PDGF can synergistically promote the early bone healing of rats with closed tibial shaft fracture, which may be related to the up-regulated expression of BMP2, VEGF and IGF-1.

Key words: Nerve growth factor; Platelet derived growth factor; Closed fracture of tibial shaft; Bone healing

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R683; R456 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2023)09-1642-05

前言

胫骨骨折是骨科临床常见的骨折类型,无论是手术、药物治疗都存在骨折不愈合或者愈合不良等情况^[1,2]。骨折愈合是几位复杂的生理过程,涉及诸多细胞、信号通路和生物分子,如骨折断端已经损伤的骨细胞、成骨细胞可表达并释放内源性生长因子以刺激间充质细胞聚集,另外还会刺激损伤部位血管增生和新生,促进间充质细胞转化为成骨细胞^[3,4]。近年的研究发现骨折断端骨痂生长和骨折愈合过程中常出现神经因子表达上调,提示神经因子对于骨折愈合有促进作用^[5]。神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)是研究较早的神经营养因子,能促进中枢和外周神经元的生长、分化、成熟,维持神经系统的正常功能,加快神经系统损伤后的修复,有研究发现 NGF 能够刺激骨细胞增殖、成骨细胞活性,加快骨折愈合^[6,7]。血小板衍生生长因子(Platelet derived growth factor, PDGF)被认为是一种骨细胞调节剂,能够刺激成骨细胞增殖,调节破骨细胞骨吸收^[8]。但 NGF 和 PDGF 之间是否能够协同促进早期骨折愈合及其潜在机制尚未有研究报道,本研究以胫骨干闭合性骨折大鼠作为研究动物,观察了肌肉注射 NGF 与 PDGF 对大鼠骨折断端病理变化、骨痂形成、血清碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)以及骨折断端骨形态发生蛋白 2 (Bone morphogenetic protein 2, BMP2)、血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)和胰岛素样生长因子-1(Insulin like growth factor-1, IGF-1)等骨折愈合促进因子的表达,以期探讨二者的骨愈合协同效果及潜在机制。

1 材料与方法

1.1 试验动物

选择健康 SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只, 体重 185~200 g, 平均体重为(194.9±4.27)g, 购买自南京医科大学动物实验中心, 动物许可证号:SCXK(苏)2021-0001。试验开始前一周在动物室适应性饲养一周, 环境温度为 22℃~25℃, 相对湿度 40%~70%, 自然昼夜, 分笼进行喂养, 每笼 5 只, 使用标准饲料进行喂养, 换气通风, 自由进食、饮水。保持环境清洁、整洁。

1.2 试验试剂、药物与仪器

注射用鼠神经生长因子(批准文号:国药准字 S20060051, 生产单位:武汉海特生物制药股份有限公司, 规格:20 μg/瓶),

血小板衍生生长因子冻干粉购自美国 Peprotech 公司, 血清 AKP 酶联免疫吸附法检测试剂盒购自合肥莱尔生物科技有限公司, 苏木精-伊红染色液、石蜡购自广州市秀威贸易有限公司, FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit、HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)、AceQ qPCR SYBR Green Master Mix Kit 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, BMP2、VEGF、IGF-1 和 β-actin 基因引物由上海生工生物工程有限公司合成, DNA marker、琼脂糖凝胶购自上海碧云天生物技术有限公司。

CX43 型光学显微镜购自日本 Olympus 公司, 电泳仪、Chemi DOC XRS 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司, 7500 型荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司, R3510 离心机及移液器购自美国 Eppendorf 公司, RT-6100 型全自动酶标分析仪购自深圳雷杜生命科学股份有限公司。

1.3 试验动物分组及模型制备^[9]

80 只大鼠随机依据随机数字表法分为模型组、NGF 组、PDGF 组和 NGF+PDGF 组, 各 20 只。腹腔注射水合氯醛溶液麻醉大鼠, 仰卧位固定于手术台, 右下肢脱毛, 在胫骨结节上方做 1.5~2 cm 切口, 逐层切开皮肤、皮下组织, 暴露中上段胫骨, 骨刀横断胫骨并完全分离断端, 建立胫骨干骨折模型; 随机经胫骨近端置入 1.0 mm 克氏针至远端穿出, 骨折复位固定后, 折返打向骨折近端, 完成造模。生理盐水冲洗后逐层缝合。

1.4 给药方式

NGF 和 PDGF 分别按照 1 mg: 200 mL 和 1 mg: 250 mL 比例进行稀释, 给予 NGF 组大鼠骨折断端肌注 0.8 μg NGF (0.2 mL); 给予 PDGF 组大鼠骨折断端肌注 0.8 μg PDGF, 给予 NGF+PDGF 组大鼠骨折断端肌注 0.8 μg NGF 和 0.8 μg PDGF; 给予模型组大鼠肌注 0.2 mL 生理盐水。各组均连续注射 7 d。

1.5 观察指标

1.5.1 X 线检查 分别在治疗第 2 周(T_0)、第 4 周(T_1)、第 6 周(T_2)在各组随机选择 10 只大鼠进行麻醉, 采用 X 线观察胫骨骨折骨痂连续性、骨折愈合情况, 同时测量骨半径、骨痂长度、骨痂半径, 采用 Perkins 法^[10]计算骨痂体积。

1.5.2 碱性磷酸酶 X 线检查结束后立即采集腹主动脉血 3 mL, 3000 rpm 离心 10 min 后分离血清, 采用酶联免疫吸附法试剂盒检测血清碱性磷酸酶(AKP)水平, 严格按照试剂盒说明

书和仪器操作规程进行检测,每个样本均进行3次重复检测,以平均值作为该样本结果。

1.5.3 胫骨骨折端病理学检查 采血结束后颈椎脱臼法处死大鼠,每组随机选择5只大鼠分离胫骨组织后固定、脱钙,梯度乙醇脱水后二甲苯固定,石蜡包埋,制成5 μm 薄片进行苏木精-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察胫骨骨折端组织病理学形态变化。

1.5.4 骨痂组织 余下5只大鼠,在胫骨骨折处上、下各2 mm取骨痂组织并精确称量约10~20 mg,冰上研磨破碎后使用FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit提取总RNA,并采用HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)反转录成cDNA。以cDNA为模板,采用AceQ qPCR SYBR Green Master Mix Kit进行荧光定量检测,扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 4 min,共40个循环,55 $^{\circ}\text{C}$ 采集荧光信号。实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行相对定量分析。所有反应设置3个复孔和无模板的阴性对照,计算Ct值,并以 β -actin mRNA为内参计算标准化Ct值作为BMP2、VEGF和IGF-1相对表达水平。

1.6 统计学方法

采用SPSS 25.0统计学软件进行数据处理和分析。计量资料表示为“平均数 $\pm$ 标准差”,多组间比较采用单因素方差分析,两两组间比较采用LSD-t检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组大鼠不同时间X线检查结果比较

T_0 时,NGF组、PDGF组和NGF+PDGF组大鼠骨折断端均可见骨痂,轮廓清晰,骨痂体积显著大于模型组,NGF+PDGF组大鼠骨痂体积显著大于NGF组和PDGF组($P<0.05$);模型组仅可见少量骨痂,骨折线清晰。 T_1 时NGF+PDGF组大鼠骨折端几乎愈合,外骨痂不明显,髓腔再通,骨痂体积显著小于 T_0 时,也显著小于同期其他三组($P<0.05$);NGF组、PDGF组大鼠骨痂明显,较 T_0 时显著增加,骨折线模糊,髓腔未通,骨痂体积均显著大于米模型组($P<0.05$);模型组骨痂增加明显,骨折线较清晰。 T_2 时NGF组、PDGF组和NGF+PDGF组大鼠骨痂塑形完成,髓腔再通,骨痂明显减少;模型组骨痂减少,但多于其他三组,骨折线消失,髓腔未通,骨痂体积显著大于其他三组($P<0.05$)。见表1。

表1 4组大鼠不同时间骨痂体积比较($\text{mm}^3, \bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of callus volume in four groups of rats at different times ($\text{mm}^3, \bar{x}\pm s$)

Groups	n	T_0	T_1	T_2
Model group	10	28.15 $\pm$ 4.92	51.62 $\pm$ 6.04	34.98 $\pm$ 5.73
NGF group	10	60.71 $\pm$ 5.37	74.92 $\pm$ 7.32	19.54 $\pm$ 3.43
PDGF group	10	56.73 $\pm$ 5.82	71.87 $\pm$ 7.58	20.25 $\pm$ 3.29
NGF+PDGF group	10	75.93 $\pm$ 5.33	27.74 $\pm$ 3.87	13.92 $\pm$ 2.75
F		39.291	45.755	12.934
P		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 4组大鼠不同时间血清AKP水平比较

4组大鼠血清AKP水平均在 T_0 时达到最高值,随后显著降低($P<0.05$)。 T_0 ~ T_1 时,NGF+PDGF组大鼠血清AKP水平均显著高于其他三组($P<0.05$),NGF组和PDGF组大鼠血清

AKP水平比较无显著差异($P>0.05$),但均显著高于模型组($P<0.05$)。 T_2 时4组大鼠血清AKP水平比较无显著差异($P>0.05$)。见表2。

表2 4组大鼠不同时间血清AKP水平比较($\text{ng/mL}, \bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of serum AKP levels in four groups of rats at different times ($\text{ng/mL}, \bar{x}\pm s$)

Groups	n	T_0	T_1	T_2
Model group	10	429.17 $\pm$ 23.84	318.92 $\pm$ 24.55	293.17 $\pm$ 13.92
NGF group	10	628.18 $\pm$ 29.62	438.76 $\pm$ 21.64	287.29 $\pm$ 12.63
PDGF group	10	621.71 $\pm$ 26.17	429.89 $\pm$ 23.81	289.28 $\pm$ 14.29
NGF+PDGF group		751.91 $\pm$ 30.73	487.54 $\pm$ 20.05	284.93 $\pm$ 13.17
F		76.843	19.733	2.984
P		<0.001	<0.001	0.331

2.3 4组大鼠不同时间胫骨骨折端病理学检查结果比较

T_0 时,NGF+PDGF组大鼠骨痂中可见较多呈条索状的新生骨小梁,数量显著多于其他三组,模型组仅有少量纤维骨痂

和软骨痂。 T_1 时,NGF组、PDGF组和NGF+PDGF组大鼠均可见骨小梁形态更加粗大、致密,呈栅栏状排列,骨小梁间的间隙变小,NGF+PDGF组大鼠骨断裂处被新生骨填满,NGF组、

PDGF 组骨断裂处仍有少量间隙;模型组骨小梁数量显著增加,但显著少于其他三组。 T_2 时,NGF 组、PDGF 组和 NGF+PDGF 组大鼠骨折愈合,模型组大鼠骨小梁形态致密、粗大,骨断裂处仍有间隙。

2.4 4 组大鼠不同时间骨痂组织中 BMP2、VEGF 和 IGF-1 mRNA 相对表达水平比较

T_1 时各组大鼠骨痂组织中 BMP2、VEGF 和 IGF-1 mRNA

相对表达水平比较均有显著差异($P<0.05$),NGF+PDGF 组大鼠相对表达水平均显著高于其他三组($P<0.05$),NGF 组和 PDGF 组大鼠各指标 mRNA 相对表达水平比较无显著差异($P>0.05$),但均显著高于模型组($P<0.05$)。 T_2 时各组大鼠骨痂组织中 BMP2、VEGF 和 IGF-1 mRNA 相对表达水平比较无显著差异($P>0.05$)。见表 3。

表 3 4 组大鼠不同时间骨痂组织中 BMP2、VEGF 和 IGF-1 mRNA 相对表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of relative expression levels of BMP2, VEGF and IGF-1 mRNA in four groups of rats at different times ($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	BMP2		VEGF		IGF-1	
		T_1	T_2	T_1	T_2	T_1	T_2
Model group	5	0.368 $\pm$ 0.013	0.437 $\pm$ 0.018	0.351 $\pm$ 0.028	0.472 $\pm$ 0.025	0.371 $\pm$ 0.042	0.412 $\pm$ 0.032
NGF group	5	0.436 $\pm$ 0.018	0.429 $\pm$ 0.021	0.522 $\pm$ 0.037	0.467 $\pm$ 0.031	0.437 $\pm$ 0.036	0.401 $\pm$ 0.028
PDGF group	5	0.421 $\pm$ 0.016	0.427 $\pm$ 0.023	0.519 $\pm$ 0.034	0.474 $\pm$ 0.027	0.429 $\pm$ 0.038	0.397 $\pm$ 0.037
NGF+PDGF group	5	0.512 $\pm$ 0.017	0.434 $\pm$ 0.020	0.671 $\pm$ 0.031	0.465 $\pm$ 0.025	0.510 $\pm$ 0.044	0.406 $\pm$ 0.035
F		47.926	1.876	68.512	1.985	24.864	1.621
P		<0.001	0.273	<0.001	0.251	<0.001	0.387

3 讨论

骨折患者经治疗后约 5%~10%出现愈合不良,将严重影响患者运动功能和生活质量,如何有效促进骨折后骨愈合是临床医生和学者共同关注的问题^[11,12]。本研究采用骨刀离断法制备胫骨干骨折模型,并行克氏针固定,避免了术后大鼠活动造成骨折对位不良引起的骨折不愈合的干扰,并使骨折模型具有较好的标准化,后续研究结果可信性提高。结果发现 NGF+PDGF 组大鼠在 T_1 时骨折断端愈合,断裂处被新生骨填满,骨痂体积大于其他三组;NGF 组、PDGF 组大鼠在 T_1 时骨裂处仍有少量间隙, T_2 时骨折断端愈合,骨痂体积大小均大于模型组,模型组大鼠 T_2 时骨折断端尚未完全愈合,骨痂体积显著大于其他三组,说明 NGF 和 PDGF 否能有效促进骨折早期愈合,王晓晨等^[13]研究也发现,NGF 有助于促进胫骨骨折大鼠骨愈合,NGF 治疗组骨痂生长更快。

AKP 主要由成骨细胞分泌,能够水解无机焦磷酸盐,促进骨盐形成和成骨过程。骨折愈合实际是骨形成相对增强和骨吸收相对减弱的过程,其中成骨细胞活跃时 AKP 表达和分泌上调,表现为血清 AKP 水平增加^[14,15]。现有研究均表明骨折愈合过程中血清 AKP 水平增加,愈合良好患者血清 AKP 水平显著高于愈合不良患者^[16,17]。本研究中 4 组大鼠血清 AKP 水平均在 T_0 时达到最高值,NGF+PDGF 组大鼠 T_0 ~ T_1 时血清 AKP 水平均显著高于其他三组,NGF 组和 PDGF 组大鼠血清 AKP 水平显著高于模型组, T_2 时 4 组大鼠血清 AKP 水平比较无显著差异($P>0.05$)。提示 AKP 在骨折早期骨愈合中发挥重要作用,NGF 和 PDGF 能够促进成骨细胞表达 AKP 进而促进骨愈合。

骨折愈合受到机体和微环境的多方面、多途径调节,包括细胞迁移、血管生成、骨痂重建等复杂过程^[18,19]。多种生物分子在骨折愈合过程中具有重要的调节作用,NGF 在体内分布较

为广泛,有研究发现 NGF 能够促进骨痂神经生成,这些神经还可释放神经肽递质以促进成骨过程^[20],另一方面 NGF 还能直接刺激细胞有丝分裂过程促进骨生成^[21,22]。PDGF 是血小板、肉芽组织等释放,也可由巨噬细胞、成骨细胞、内皮细胞在出现损伤或者特定刺激时产生的,能够刺激成骨细胞增殖、分化,并促进破骨细胞骨吸收^[23,24]。BMP2 是目前发现的唯一一种能够独立诱导间充质细胞迁移、增殖并向成骨细胞转化的细胞因子,加速骨重建、促进骨折愈合^[25,26]。VEGF 是一种促血管生成因子,能够通过诱导骨折端血管生成;还能直接作用于骨-软骨细胞,促进骨形成和分化^[27,28]。IGF-1 是骨细胞中含量较丰富的一种生长因子,能够促进成骨细胞活性,增加其增殖和分化能力,增加骨沉积;还可促进骨基质合成,加快骨折愈合^[29,30]。本次研究发现, T_1 时各组大鼠骨痂组织中 BMP2、VEGF 和 IGF-1 mRNA 相对表达水平比较均有显著差异,NGF+PDGF 组大鼠相对表达水平均显著高于其他三组,NGF 组和 PDGF 组大鼠各指标 mRNA 相对表达水平均显著高于模型组($P<0.05$), T_2 时各组大鼠各指标 mRNA 相对表达水平无显著差异,说明 NGF 和 PDGF 能够在骨折后早期通过上调 BMP2、VEGF 和 IGF-1 表达水平,促进了间充质细胞迁移、增殖并转化为成骨细胞,促进了骨折端微血管生成,提高骨折端营养物质水平,增加了成骨细胞增殖分化、骨沉积,共同促进骨折愈合。而 NGF 和 PDGF 具有协同作用,使骨折愈合时间缩短。

综上,NGF 和 PDGF 都能够促进胫骨干闭合骨折大鼠早期骨愈合,二者有显著的协同促进作用,其机制可能与两种因子均能够促进 BMP2、VEGF 和 IGF-1 表达上调有关。但本研究未对两种因子通过何种协同作用机制上调 BMP2、VEGF 和 IGF-1 等相关因子表达进入深入的探讨,仍需从分子角度进行研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Tian R, Zheng F, Zhao W, Zhang Y, et al. Prevalence and influencing factors of nonunion in patients with tibial fracture: systematic review and meta-analysis[J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 5(1): 377
- [2] Jang Y, Gaski G, Natoli R, et al. Tibial Fracture Healing Score: A Novel Tool to Predict Tibial Nonunion [J]. *Orthopedics*, 2020, 43(4): e323-e328
- [3] Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(1): 45-54
- [4] Klavert J, van der Eerden BCJ. Fibronectin in Fracture Healing: Biological Mechanisms and Regenerative Avenues [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9(5): 663357
- [5] Zhang Z, Hu P, Wang Z, et al. BDNF promoted osteoblast migration and fracture healing by up-regulating integrin $\beta 1$ via TrkB-mediated ERK1/2 and AKT signalling [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24 (18): 10792-10802
- [6] Yang B, Ma TY, Ma W. New Research of Nerve Growth Factor on Fracture Healing[J]. *Acta Acad Med Sinicae*, 2020, 42(4): 546-551
- [7] Sekiguchi H, Inoue G, Shoji S, et al. Expression of nerve growth factor in the callus during fracture healing in a fracture model in aged mice [J]. *Biomed Mater Eng*, 2022, 3(2): 131-137
- [8] Li DQ, Wan QL, Pathak JL, et al. Platelet-derived growth factor BB enhances osteoclast formation and osteoclast precursor cell chemotaxis[J]. *J Bone Miner Metab*, 2017, 35(4): 355-365
- [9] 袁鹤, 童九辉, 王斌, 等. 局部注射神经生长因子及碱性成纤维生长因子对大鼠胫骨骨折愈合的影响 [J]. *中华解剖与临床杂志*, 2020, 25(1): 74-81
- [10] 刘建军, 黄亮, 韩庆斌, 等. 神经生长因子对大鼠胫骨骨折愈合的影响及其机制[J]. *山东医药*, 2016, 56(32): 27-29
- [11] Nicholson JA, Makaram N, Simpson A, et al. Fracture nonunion in long bones: A literature review of risk factors and surgical management[J]. *Injury*, 2021, 52(Suppl 2): S3-S11
- [12] Yeo JH, Kim JY. Surgical Strategy for Scaphoid Nonunion Treatment[J]. *J Hand Surg Asian Pac Vol*, 2018, 23(4): 450-462
- [13] 王晓晨, 胡海燕, 向继林, 等. 神经生长因子对胫骨骨折大鼠骨力学、骨强度及骨桥蛋白及下游相关因子水平的影响[J]. *临床骨科杂志*, 2022, 25(5): 745-749
- [14] Green MR, Sambrook J. Alkaline Phosphatase [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2020, 17(8): 100768
- [15] Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization[J]. *Gene*, 2020, 754(5): 144855
- [16] Guo Y, Chi X, Wang Y, et al. Mitochondria transfer enhances proliferation, migration, and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cell and promotes bone defect healing[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 245
- [17] Zhang W, Zhou X, Hou W, et al. Reversing the imbalance in bone homeostasis via sustained release of SIRT-1 agonist to promote bone healing under osteoporotic condition [J]. *Bioact Mater*, 2022, 19(2): 429-443
- [18] Diomedea F, Marconi GD, Fonticoli L, P et al. Functional Relationship between Osteogenesis and Angiogenesis in Tissue Regeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3242
- [19] ElHawary H, Baradaran A, Abi-Rafeh J, et al. Bone Healing and Inflammation: Principles of Fracture and Repair[J]. *Semin Plast Surg*, 2021, 35(3): 198-203
- [20] Xu J, Li Z, Tower RJ, et al. NGF-p75 signaling coordinates skeletal cell migration during bone repair[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(11): eabl5716
- [21] Carr MJ, Toma JS, Johnston APW, et al. Mesenchymal Precursor Cells in Adult Nerves Contribute to Mammalian Tissue Repair and Regeneration[J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(2): 240-256.e9
- [22] Yang S, Cheng J, Man C, et al. Effects of exogenous nerve growth factor on the expression of BMP-9 and VEGF in the healing of rabbit mandible fracture with local nerve injury[J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1): 74
- [23] Zhen G, Dan Y, Wang R, et al. An antibody against Siglec-15 promotes bone formation and fracture healing by increasing TRAP+ mononuclear cells and PDGF-BB secretion [J]. *Bone Res*, 2021, 9(1): 47
- [24] Cecerska-Heryć E, Goszka M, Serwin N, et al. Applications of the regenerative capacity of platelets in modern medicine [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2022, 64(5): 84-94
- [25] Begam H, Nandi SK, Kundu B, et al. Strategies for delivering bone morphogenetic protein for bone healing [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 70(Pt 1): 856-869
- [26] Tian H, Zhao J, Brochmann EJ, et al. Bone morphogenetic protein-2 and tumor growth: Diverse effects and possibilities for therapy [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2017, 4(1): 73-91
- [27] Hu K, Olsen BR. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(2): 509-26
- [28] Liu Y, Zhu Z, Pei X, et al. ZIF-8-Modified Multifunctional Bone-Adhesive Hydrogels Promoting Angiogenesis and Osteogenesis for Bone Regeneration [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(33): 36978-36995
- [29] Locatelli V, Bianchi VE. Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis[J]. *Int J Endocrinol*, 2014, 13(10): 235060
- [30] Kirby DJ, Buchalter DB, Anil U, et al. DHEA in bone: the role in osteoporosis and fracture healing [J]. *Arch Osteoporos*, 2020, 15(1): 84