

• 实验研究 •

神经生长因子对兔合并局部神经损伤的下颌骨骨折愈合中 BMP-2 表达的影响*

吕桂浩¹ 蒋练¹ 满城¹ 向晓波¹

[摘要] 目的:通过鼠神经生长因子(NGF)在兔合并局部神经损伤的下颌骨骨折模型的局部应用,观察 NGF 对 BMP-2 表达的影响,初步探讨 NGF 促进合并局部神经损伤的下颌骨骨折愈合的分子机制。方法:将 48 只新西兰大白兔随机分为实验组(下颌骨骨折+切断神经束+以明胶海绵为载体的 NGF)、对照组(下颌骨骨折+切断神经束+以明胶海绵为载体的 NS)、空白组(下颌骨骨折+切断神经束)和完整组(下颌骨骨折+保留神经束)。手术建模后分别于 2、4、6、8 周每组各处死实验动物 3 只,苏木精-伊红染色观察下颌骨骨折愈合情况,荧光定量 PCR 检测 BMP-2 表达的改变。结果:苏木精-伊红染色观察到骨折区成骨现象:实验组较对照组明显,完整组较空白组明显,对照组与空白组相近。PCR 早期结果差异有统计学意义,BMP-2 表达在 2 周时达到最高峰后在中后期均呈下降趋势且下降幅度随时间减小。结论:局部应用 NGF 能够促使 BMP-2 在合并局部神经损伤的下颌骨骨折愈合的早期表达升高,这可能是 NGF 促进下颌骨骨折愈合的分子机制之一。

[关键词] 神经生长因子;下颌骨折;BMP-2

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2016.07.007

[中图分类号] R338 **[文献标志码]** A

The effect of nerve growth factor on the expression of BMP-2 in the healing of rabbits' mandibular fracture with partial nerve injury

LV Guihao JIANG Lian MAN Cheng XIANG Xiaobo

(Stomatological Hospital Affiliated to Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou, 563003, China)

Corresponding author: JIANG Lian, E-mail: jianglain1964@163.com

Abstract Objective: To observe the effect of NGF on the expression of BMP-2 in rabbit model and explore the molecular mechanism of NGF which might promote the healing of mandibular fracture with nerve injury. **Method:** The 48 New-Zealand white rabbits were randomly divided into the experimental group (mandibular fracture + to cut off the nerve bundle + NGF by GS), the control group (mandibular fracture + to cut off the nerve bundle + NS by GS), the blank group (mandibular fracture + to cut off the nerve bundle) and the full-set group (mandibular fracture + retains the nerve bundle). After 2 weeks, 4 weeks, 6 weeks and 8 weeks, 3 rabbits were sacrificed in each group for HE staining and RT-PCR, respectively. **Result:** HE staining showed the osteogenesis phenomenon; the experimental group was clearer than control group, the full-set group was clearer than the blank group and the control group is similarly to the blank group. RT-PCR results revealed that there was a statistically significance in the early stage. The expression of BMP-2 peaked in 2 weeks and decreased later with time. **Conclusion:** The local application of NGF can prompt BMP-2 expression in the early stages of the mandibular fracture with partial nerve injury healing and this may be one of the molecular mechanisms.

Key words nerve growth factor; mandibular fractures; BMP-2

现代颌骨骨折愈合机制研究的发展已经由早期传统的细胞生物学深入到骨组织再生重组的分子层面,神经生长因子(nerve growth factor, NGF)应用于骨科领域的价值逐渐引起重视。下颌骨解剖结构的特殊性决定了下颌骨骨折的同时常伴有神经束的损伤甚至断裂^[1]。骨折的修复是一种本

能性的生理反应,需要机体内各种调节系统共同协调控制。局部神经束的损伤会使严格的骨修复程序遭到破坏,进而影响下颌骨骨折修复的质量^[2]。NGF 是一类神经营养因子,能通过多种机制发挥作用影响骨折愈合,尤其是 NGF 与骨生长因子之间的相互作用成为近年骨折愈合分子机制的研究热点^[3]。BMP-2 是唯一能单独诱导骨形成的因子,也是在骨形成蛋白的 20 多种亚型中活性最强的一类^[4]。本研究旨在建立兔合并局部神经损伤的下颌骨骨折模型的基础上,以明胶海绵为载体局部使用鼠 NGF 干预骨折愈合过程,观察 NGF 对

* 基金项目:贵州省科技厅资助项目[No:黔科合 J 字 LKZ (2010)03 号];贵州省遵义市红花岗区科技局资助项目 [No:遵红科合社字 LKZ(2009)10 号]

¹ 遵义医学院附属口腔医院(贵州遵义,563003)
通信作者:蒋练, E-mail: jianglain1964@163.com

BMP-2 表达的影响,初步探讨 NGF 促进合并局部神经损伤的下颌骨折愈合的分子机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

选用新西兰白兔 6~8 月龄 48 只,雌雄各半(由重庆医科大学实验动物中心提供),体重(2 500±300)g,术前饲养 1 周,确定无全身性疾病。随机分为 4 组:实验组(下颌骨骨折+切断神经束+以明胶海绵为载体的 NGF)、对照组(下颌骨骨折+切断神经束+以明胶海绵为载体的 NS)、空白组(下颌骨骨折+切断神经束)和完整组(下颌骨骨折+保留神经束)。

1.2 实验动物模型的建立

麻醉:3%戊巴比妥钠,兔耳缘静脉注射(1 ml/1 000 g 体重)。手术:下颌下区备皮,常规消毒铺巾。动物麻醉生效后,于下颌骨颏部下方沿正中联合逐层切开分离至骨膜,暴露下颌骨体部,寻找双侧颏孔并分离神经束,使用快速涡轮机金刚沙车针于双侧颏孔下方磨切出贯通颊舌侧的不完全性骨折区(约 1 mm×5 mm),磨切期间使用生理盐水冲洗降温。实验组、对照组、空白组贴颏孔切断神经束,完整组完好保留神经束。注射用鼠 NGF(30 μg/瓶,生物学活性≥15 000 AU,舒泰神北京生物制药股份有限公司)用生理盐水稀释至 10 μg/ml^[5],以可吸收性明胶海绵(江西省祥恩医疗科技发展有限公司)为载体置入实验组动物骨折线处,对照组于骨折断端置入等量的以明胶海绵为载体的生理盐水。完整组与空白组不予任何干扰。术后分笼饲养,局部清洁,伤口均一期愈合。

1.3 骨痂组织的形态学观察

于术后第 2、4、6、8 周,4 组动物各处死 3 只取单侧下颌骨骨折处标本,用生理盐水冲洗后立即置入 4%的多聚甲醛中(pH 为 7.4),4℃下固定 48 h。EDTA 溶液脱钙,梯度乙醇脱水,石蜡包埋切片,苏木素-伊红染色观察骨痂中成骨现象。

1.4 RT-PCR 检测不同时期骨痂组织中 BMP-2mRNA 的表达

在各组动物分批处死同期迅速用咬骨钳钳取

对侧下颌骨骨折处约 100 mg 骨痂组织,液氮速冻、保存,骨组织总 RNA 提取后纯化,逆转录出 cNDA 后进行 real-time PCR,用相对定量法分析处理结果^[6]。所用引物序列,BMP-2:GAGAAAAGCGT-CAAGCGAAAC, AGTAAAAGGCGTGATACCC -CG;GAPDH:CACCCACTCCTCTACCTTCG,CGT-CCTCCTCTGGTGCTCT(TaKaRa 生物工程公司合成)。

1.5 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件,计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。检验标准设定 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苏木精-伊红染色光镜下观察

各组成骨现象在骨折后第 2、4 周时表现最活跃,镜下观察成骨细胞和新生毛细血管:实验组较对照组更密集,完整组较空白组更密集,对照组与空白组相近。苏木精-伊红染色对比观察见图 1。

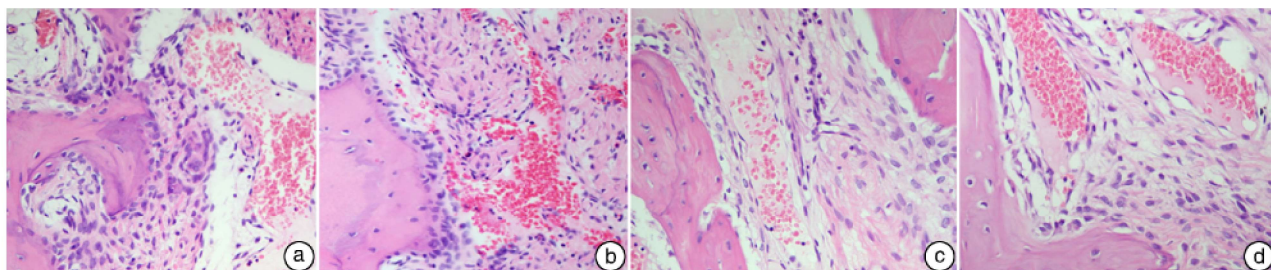
2.2 Real-time RT-PCR 结果

每例样本反应结束后由计算机自动计算并读出定量结果 Ct 值。Ct 值采用 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 法进行相对定量,结果统计以 $\bar{x} \pm s$ 表示,见图 2。

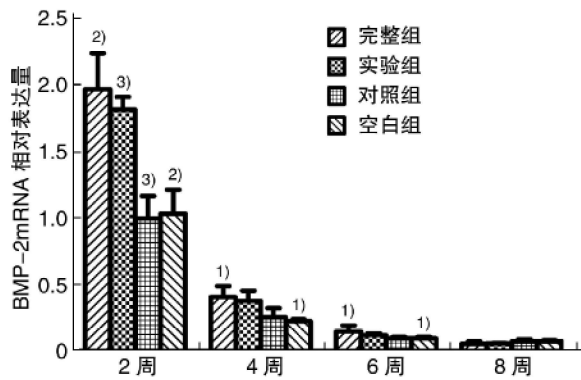
4 个时间段中在第 2 周时各组 BMP-2 的表达达到最高峰,此后各组 BMP-2 的表达量均呈下降趋势,其下降幅度随时间延长而减小。第 2 周时实验组明显高于对照组(*P* < 0.01),完整组明显高于空白组(*P* < 0.01);第 4、6 周时实验组仍均高于对照组但差异无统计学意义,完整组高于空白组(*P* < 0.05);第 8 周时各组比较差异无统计学意义。

3 讨论

局部神经的存在可有效传导痛觉进而能够防止骨折断端过度活动,而神经束切断后,骨折局部保护性痛觉传递消失,骨折断端微动势必增加,这种微动所产生的应力对骨折愈合的形式和骨痂质量均有影响,并可能导致大量骨痂形成^[7]。本研究参考对失神经下颌骨骨折研究的相关文献^[8],采用的不完全性下颌骨骨折模型有效避免了模型制作



a:完整组;b:实验组;c:对照组;d:空白组。
图 1 各组 2 周时光镜下观察(苏木精-伊红染色 ×400)



与空白组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与对照组比较,³⁾ $P < 0.01$ 。

图 2 下颌骨骨折愈合不同时期 BMP-2mRNA 的相对表达

过程中对神经束造成不必要的损伤,进而避免了对实验结果的干扰,增加了实验的可靠性和重复性。

在 4 个时间段中的第 2 周时各组 BMP-2 的表达达到最高峰,此后各组 BMP-2 的表达量均呈下降趋势,其下降幅度随时间减小。实验组在第 2 周 BMP-2 表达量明显高于对照组 ($P < 0.01$),说明 NGF 对于骨折愈合初期 BMP-2 的表达具有明显的促进作用。完整组在第 2 周 BMP-2 表达量明显高于空白组 ($P < 0.01$),且在第 4、6 周 BMP-2 表达量仍均高于空白组 ($P < 0.05$),说明局部神经的损伤不利于 BMP-2 的表达从而影响下颌骨骨折的愈合。而对照组与空白组差异无统计学意义,说明在本实验中明胶海绵对于骨折愈合并无明显影响。虽然第 4、6 周时实验组与对照组比较差异无统计学意义,但也在一定程度上反映了 BMP-2 表达的情况,与下颌骨骨折愈合的组织学表现是大致相吻合的。在第 8 周时各组差异很小,但对照组与空白组略高于完整组与实验组,推测可能是神经束的损伤延迟了下颌骨的骨折愈合周期所引起的。实验组骨组织中 BMP-2 在下颌骨骨折愈合早期、中期表达增强,在下颌骨骨折愈合后期表达下降缓慢,说明 NGF 促进骨折愈合的可能机制之一是通过促进 BMP-2 的表达促进成骨进而有利于骨折愈合。此外,NGF 对于促进周围神经表达相关神经肽类物质进而影响下颌骨骨折愈合的机制^[9-10]尚需进一步研究。

鼠 NGF 在临床中治疗神经损伤效果明显,通过外源性 NGF 能够有效促进神经损伤的愈合,缩短失神经支配的时间,大大提升了局部神经在骨折

愈合过程中的积极意义^[11]。通过苏木精-伊红染色可以观察到实验组相比于对照组成骨细胞活性更显著,新生血管更密集,成骨现象更明显,骨折愈合情况较佳^[12-13]。本研究为外源性 NGF 的局部应用促进合并局部神经损伤的下颌骨骨折的愈合提供了实验依据。

参考文献

- [1] 皮昕,王美青,何三纲,等.口腔解剖生理学[M].北京:人民卫生出版社,2012:99-103.
- [2] 张贵春,张永先.神经生长因子对合并神经损伤胫骨骨折早期愈合的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(11):2057-2061.
- [3] 郭贵高,石长贵,苏佳灿.神经生长因子促进骨折愈合研究进展[J].国际骨科学杂志,2010,31(5):288-290.
- [4] 石长贵,蔡筑韵,鲍哲明,等.骨生长因子促进骨折愈合研究进展[J].国际骨科学杂志,2010,31(3):184-186.
- [5] 梅玲,查佳安,汪琼,等.神经生长因子对兔下颌骨缺损愈合影响的实验研[J].口腔医学研究,2012,28(8):775-779.
- [6] 任可,张春才,赵建宁,等.持续动态压应力对实验性骨折愈合的影响及相关信号转导通路研究[J].中国矫形外科杂志,2010,18(4):327-332.
- [7] MADSEN J E, HUKKANEN M, AUNE A K, et al. Fracture healing and callus innervation after peripheral nerve resection in rats[J]. Clin Orthop Relat Res, 1998,351:230-240.
- [8] 徐琳,谭颖徽,葛永玲,等.离断下齿槽神经对兔下颌骨骨折愈合影响的实验研究[J].口腔颌面外科杂志,2006,16(1):19-22.
- [9] 王光涛,谢利民.骨折愈合过程中的局部神经调节[J].中医正骨,2004,16(3):59-60.
- [10] 李焰,谭颖徽,张纲,等.兔下颌骨骨折愈合中降钙素基因相关肽对一氧化氮合成酶调控的实验研究[J].实用口腔医学杂志,2008,24(1):78-81.
- [11] 李东海,周安宁.周围神经损伤后局部应用神经生长因子对骨折早期愈合的影响[J].中国实用神经疾病杂志,2014,17(22):68-69.
- [12] 刘宇鹏,赵德伟,王卫明,等.神经生长因子可促进骨折愈合过程中血管内皮生长因子的表达[J].中国组织工程研究,2014,18(24):3863-3869.
- [13] 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.

(收稿日期:2015-12-07)