doi:10.11659/jjssx.08E018072

·临床研究·

血管活性肠肽在人颅脑损伤伴骨折中的表达及意义

罗成军[1],王庭刚[2],田 铸[2] (1.乐山市人民医院神经外科,四川 乐山 614000;2.陆军军医大学第一附属医院急救部,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨外周血中血管活性肠肽(VIP)在颅脑损伤合并骨折时的表达及意义。**方法** ELISA 检测血管活性肠肽及成骨标志性因子核心结合因子 1(Cbfa1)在颅脑损伤合并骨折、单纯骨折、单纯颅脑损伤患者及正常志愿者中的表达,X 射线评价颅脑损伤合并骨折及单纯骨折组的骨折愈合情况。**结果** 血管活性肠肽在颅脑损伤合并骨折患者中的表达明显高于单纯骨折患者和正常人;Cbfa1 在颅脑损伤合并骨折患者中的表达高于单纯骨折组,并且 Cbfa1 的表达强度与颅脑损伤程度相关,X 射线证实血管活性肠肽和 Cbfa1 表达水平高的颅脑损伤合并骨折患者的骨折愈合加速。**结论** 颅脑损伤导致的血管活性肠肽的高表达与骨折愈合呈正相关。

[关键词] 血管活性肠肽;核心结合因子 1;颅脑损伤;骨折;骨不连; 免疫调节;异位骨化

[中图分类号] R651.15;R683 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-10-09

Expression and significance of vasoactive intestinal peptide in human traumatic brain injury combined with fracture

LUO Cheng-jun[1], WANG Ting-gang[2], TIAN Zhu[2] (1. Department of Neurosurgery, Leshan People's Hospital, Leshan Sichuan 614000, China; 2. Emergency Department, the First Hospital Affiliated to Army Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of vasoactive intestinal peptide (VIP) in patients with traumatic brain injury (TBI) combined with fracture. **Methods** The expression of VIP and osteogenic factor Cbfa1 in peripheral blood of patients with TBI combined with fracture, TBI only, fracture only and normal volunteers were detected by ELISA, and the fracture healing of TBI combined fracture and simple fracture group were evaluated by X-Ray. **Results** The expression of VIP in patients with TBI combined with fracture was significantly higher than those of simple fracture patients and normal volunteers. The expression of Cbfa1 in patients with TBI combined with fracture was significantly higher than those of simple fracture group, the expression intensity of Cbfa1 was related to the degree of brain injury, and the accelerated fracture healing in patients with TBI combined fractures were observed by X-Ray. **Conclusion** The high expression of VIP caused by TBI is positively correlated with fracture healing.

Keywords: vasoactive intestinal peptide; core binding factor 1; traumatic brain injury; fracture; bone nonunion; immunoregulation; heterotopic ossification

骨折是骨的完整性受到破坏,骨折的愈合涉及成骨细胞和破骨细胞的动态平衡,一方面骨诱导因子诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化并促进成骨,另一方面,单核细胞分化成为破骨细胞并行使破骨作用,促进骨吸收[1]。成骨细胞对于骨折后的新骨形成至关重要,成骨标志性因子核心结合因子 1(core binding factor 1,Cbfa1)属于 runt 结构域基因家族,通过 runt 与 DNA 接合,其通过调节成骨分化标志基因和成骨表型相关基因的表达而促进骨分化和骨形成[2]。骨创伤及愈合过程受多种因素的影响,临床发现颅脑损伤后会出现骨痂过度生长,异位骨化率增加,骨折愈合加快的现象,但其具体机制尚不清楚[3]。

血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide,VIP)是由 28 个氨基酸组成的肽类神经递质和内分泌免疫调节肽,因其具有明显的扩血管作用而得名[4]。其主要由中枢和外周神经系统不同区域的神经元产生,由副交感神经节后纤维释放,此外,也可由炎性反应细胞、淋巴细胞和内分泌细胞分泌。VIP 在多个代谢活性器官表达,在体内作为促分泌剂、血管扩张剂、免疫调节剂和神经递质等发挥重要的作用。在大鼠模型中,仅有脑外伤合并骨折组骨折愈合较单纯股骨骨折组快的现象报道[5],但 VIP 与人骨折愈合的研究未见报道。为研究 VIP 在颅脑损伤合并骨折愈合中的作用,我们对临床颅脑损伤合并骨折与单纯骨折患者 VIP 表达与骨折愈合的关系进行了探讨。

[基金项目] 国家自然科学基金(81471862);西南医院院管课题(SWH2016BZGFKJ-37、SWH2016BZGFKJ-34)

[通信作者] 田 铸,E-mail:224137067@qq.com

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2015年1月至2018年1月陆军军医大学第一附属医院急救部收治的患者30例,其中男22例,女8例。30例患者分为单纯脑创伤组(TBI组)8例,单纯骨折组(Fracture组)12例,脑损伤合并骨折组(TBI + Fracture组)10例。入院时有脑损伤的患者按GCS评分分级:GCS > 12分为轻度脑损伤(7例),9分≤GCS≤12分为中度脑损伤(6例),3分≤GCS≤8分为重度脑损伤(5例)。另选择健康体检志愿者10例为对照组(Control组)。本研究经陆军军医大学伦理委员会批准,患者签署知情同意书。

1.2 血清样本的收集

所有患者在伤后1 d内采静脉血3 mL,正常人早晨空腹采静脉血3 mL,4 ℃冰箱放置过夜,3 500 g离心10 min,吸出上层血清置于-80 ℃冰箱保存备用。

1.3 ELISA检测血清中VIP、Cbfa1含量

人VIP和人Cbfa1 ELISA试剂盒均购自上海沪鼎生物科技有限公司。实验操作按说明书进行。

1.4 X射线评价骨折愈合情况

选取VIP和Cbfa1表达高的颅脑损伤合并骨折组与单纯骨折组的患者常规拍摄X射线片,时间节点选在入院、伤后4周、8周、12周,通过观察骨痂出现的时间来判断骨折愈合的速度,阅片由同一名医生完成。

1.5 统计学分析

数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用GraphPad Prism 5软件进行统计分析,两个样本之间的比较采用t检验;$P < 0.05$为差异有统计学意义,$P < 0.01$为差异有极显著性统计学意义。

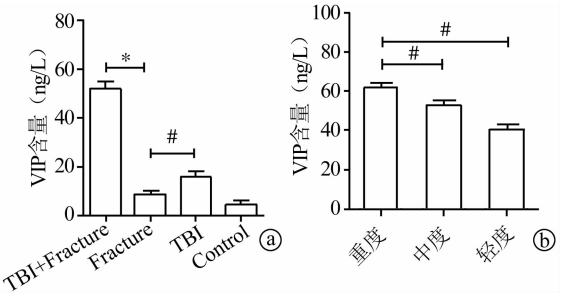
2 结果

2.1 VIP在外周血中的表达

ELISA结果显示,颅脑损伤合并骨折患者血清中VIP的含量(52.03 ± 5.777) ng/L明显高于单纯骨折组(8.57 ± 1.619) ng/L,单纯颅脑损伤组血清中的VIP含量(16.00 ± 2.082) ng/L高于单纯骨折组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);单纯骨折组和正常对照组VIP含量比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图1a。脑损伤促进了VIP的释放,同时重度脑损伤患者血清中VIP的含量高于中度和轻度脑损伤患者,说明脑损伤程度与血管活性肠肽的释放呈正比,见图1b。

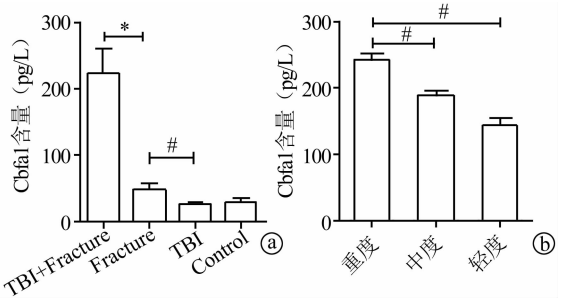
2.2 Cbfa1在外周血中的表达

ELISA结果显示,颅脑损伤合并骨折患者血清中Cbfa1的含量(223.61 ± 15.609) pg/L明显高于单纯骨折组(48.08 ± 8.281) pg/L和单纯颅脑损伤组(26.33 ± 3.844) pg/L,差异均具有统计学意义($P < 0.05$);单纯骨折组和正常对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图2a。重度颅脑损伤患者血清中Cbfa1的含量明显高于中度和轻度损伤患者,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图2b。



a:各组VIP含量比较;b:不同程度脑损伤VIP的含量比较
*:$P < 0.01$;#:$P < 0.05$

图1 VIP在外周血中的表达



a:各组Cbfa1含量比较;b:不同程度脑损伤Cbfa1的含量比较
*:$P < 0.01$;#:$P < 0.05$

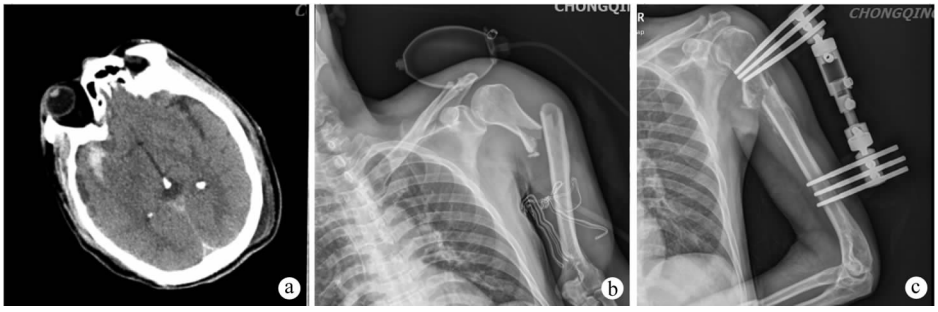
图2 Cbfa1在外周血中的表达

2.3 临床VIP表达与骨折愈合的关系

外周血VIP与Cbfa1表达的检测结果显示,VIP与Cbfa1的表达呈正相关。为进一步明确在体内VIP表达与骨折愈合的关系,我们对VIP表达高的颅脑外伤合并骨折和单纯骨折患者的骨愈合进行了追踪。结果发现,所有颅脑损伤合并肱骨骨折的病例,在骨折后(8 ± 1)周X射线观察到骨折处明显有大量骨痂生长(图3),而单纯骨折组的明显骨痂时间为(12 ± 1)周,差异具有统计学意义($P < 0.05$),说明颅脑损伤导致的VIP的高表达与骨折愈合相关。

3 讨论

骨修复一直是骨科学的基本问题,骨科棘手疾病如骨不连、骨缺损(尤其是大片骨缺损、陈旧性骨缺损)的治疗实际上是促进骨修复的过程。临床上的治疗方法主要是骨移植手术[1],但骨移植受移植骨来源及质量的限制。因此人们一直在寻找骨修复的其他有



a:颅脑损伤 CT;b:肱骨干骨折 X 射线片; c:骨折后 8 周肱骨干骨折 X 射线片

图 3 典型 TBI 伴骨折的影像学资料

效方法。

颅脑创伤伴有骨折的愈合加速是临床的一种现象,对于此现象研究很多,动物实验和临床结果均表明颅脑损伤后,可促进骨痂的形成,增加骨痂的大小和骨体积,促进间充质干细胞向成骨细胞的分化等作用,但是确切机制并不清楚[6-9]。目前观点认为:①脑损伤导致血脑屏障的破坏,使脑组织中与成骨相关的生长因子释放入血液促进骨折愈合;②脑损伤可刺激外周神经,从而引起骨折处分泌促进骨折愈合的神经肽;③脑损伤刺激脑垂体引起神经内分泌功能紊乱,导致与骨愈合有关的激素水平增高而促进成骨,加速骨折愈合[10-15]。我们通过外周血实验检测和患者影像学结果发现,VIP 在颅脑创伤后外周血中明显增加,并且 VIP 的增加与骨折愈合的程度和时间相关,说明脑损伤后神经细胞分泌的因子对骨折愈合具有重要作用。

VIP 是具有多重作用的肽类物质,但对于 VIP 和骨折愈合的关系报道较少。仅见有 VIP 与大鼠骨折后骨痂的形成有关[5];VIP 可改善骨关节炎大鼠膝关节病理状态,降低血清中 TNF-α、IL-1、IL-2、IL-6 的表达,促进软骨细胞增殖[16];VIP 表达与骨折后微血管密度大小变化呈正相关,并促进骨痂新生血管的形成[17],但对在人体颅脑创伤和骨折愈合的关系未见报道。本研究结果表明,临床上单纯骨折组和对照组的 VIP 表达无显著差异,而 TBI 合并骨折组的 VIP 表达明显上调,同时颅脑损伤后 Cbfa1 的表达也增加,与 VIP 增加的表达呈现相关性,可以理解为 VIP 的表达上调增强了 Cbfa1 的表达,但是 VIP 是通过什么途径来调节 Cbfa1 表达的途径仍不清楚。以往的研究发现,患者的关节组织内存在大量活化的淋巴细胞、巨噬细胞,这些细胞可分泌 TNF-α、IL-1、IL-17、IL-7、IFN-γ,活化 T 细胞分泌破骨细胞生成因子等炎症因子并促进破骨细胞增殖、分化和成熟。如类风湿关节炎患者体内有大量 Th17 细胞,其释放 IL-17 可促进破骨细胞的分化和成熟,加剧骨不连[18];而这些患者体内也存在 Foxp3 阳性的调节性 T 细胞(Treg)分泌 TGF-beta 促进成骨细胞的分化并调节关节局部 T 细胞的活化,从而部分促进骨修复[19];绝经期妇女由于雌激素水平低导致体内 T 细胞活化,这些细胞可分泌大量 TNF-α 并造成骨质疏松。此外,成骨细胞也具有免疫调节功能,其可调节 T 细胞和 B 细胞的活化并参与免疫调节。因此,活化的 T 细胞通过释放多种效应的细胞因子调节成骨细胞和破骨细胞的动态平衡过程,我们前期研究证实可溶性 B7-H3 在人脑创伤合并骨折愈合中的表达升高[20]。VIP 可通过作用于免疫细胞,调控参与上述多种细胞因子的分泌[21-22]。那么,是否脑损伤后神经系统释放 VIP,VIP 是否作用于免疫细胞释放细胞因子、激素等,再通过 Cbfa1 作用于成骨细胞促进成骨呢? 下一步我们将从免疫学方面探讨 VIP 对骨折愈合的影响。

本研究还发现重度脑损伤患者外周血中 VIP 和 Cbfa1 的含量高于轻度和中度患者。有文献报道,重度损伤脑损伤会增加 BMP(骨形成蛋白)表达,释放更多的神经因子,如 P 物质和 CGRP,或促进 thrombin(凝血酶)的释放,使成骨细胞发生过度增殖和减少凋亡,导致异位性骨化[23],说明重度脑损伤患者对细胞因子释放的不可控性会导致骨愈合障碍。由于骨愈合是个多因素控制的过程, VIP 的过度释放,一方面导致骨愈合加速,另一方面,是否会破坏骨折部位的免疫微环境,导致异位性骨化产生? 此方面也有待进一步研究。

对于骨折与脑创伤的关系,虽然较多的研究表明颅脑创伤可促进骨折愈合[3,6-7,10],但骨折对颅脑的不良影响也不容忽视。文献报道长骨骨折会促进颅脑损伤诱导产生的淋巴细胞的迁移,加重微血管渗漏和脑水肿,延缓神经功能的恢复,并且损害学习记忆能力。因此骨折和脑创伤的关系还需深入研究[24-25]。

总之,我们的实验结果表明,人类颅脑创伤释放的 VIP 与骨折愈合相关,并且 VIP 的表达强度与颅脑损伤程度相关。

[参考文献]

[1] Service RF. Tissue engineers build new bone[J]. Science, 2000, 289(9):1498-1500. doi: 10.1126/science.289.5484.1498.

[2] Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts[J]. Cell, 1997, 89(5):755-764. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80258-5.

[3] Morley J, Marsh S, Drakoulakis E, et al. Does traumatic brain injury resultin accelerated fracture healing[J]. Injury, 2005, 36(3): 363-368. doi: 10.1016/j.injury.2004.08.028.

[4] Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions[J]. Amino Acids, 2013, 45(1):25-39. doi: 10.1007/s00726-011-1184-8.

[5] 郑若昆,汪贺轩. 神经肽Y、血管活性肠肽在脑外伤合并股骨骨折大鼠模型骨痂中的表达及意义[J]. 中医学报, 2013, 28(3):375-377. doi:10.16368/j.issn.1674-8999.2013.03.070.

[6] Boes M, Kain M, Kakar S, et al. Osteogenic effects of traumatic brain injury on experiment fracture-healing[J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(4):738-743. doi:10.2106/JBJS.D.02648.

[7] Huang W, Li Z, Li Z, et al. Does traumatic brain injury result in accelerated mandibular fracture healing[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2012, 70(9):2135-2142. doi:10.1016/j.joms.2012.04.016.

[8] Brady RD, Grills BL, Church JE, et al. Closed head experimental traumatic brain injury increases size and bone volume of callus in mice with concomitant tibial fracture[J]. Sci Rep, 2016, 6:34491. doi:10.1038/srep34491.

[9] Garg P, Mazur MM, Buck AC, et al. Prospective review of mesenchymal stem cells differentiation into osteoblasts[J]. Orthop Surg, 2017, 9(1): 13-19. doi: 10.1111/os.12304.

[10] Zhang R, Liang Y, Wei S. M2 macrophages are closely associated with accelerated clavicle fracture healing in patients with traumatic brain injury: a retrospective cohort study[J]. J Orthop Surg Res, 2018, 13(1):213. doi: 10.1186/s13018-018-0926-7.

[11] Bajwa NM, Kesavan C, Mohan S. Long-term consequences of traumatic brain injury in bone metabolism[J]. Front Neurol, 2018, 9:115. doi: 10.3389/fneur.2018.00115.

[12] Sang X, Wang Z, Qin T, et al. Elevated concentrations of hypoxia-inducible factor-1α in patients with fracture and concomitant traumatic brain injury[J]. Ann Clin Biochem, 2017, 54(5):584-592. doi: 10.1177/0004563216673087.

[13] Song Y, Han GX, Chen L, et al. The role of the hippocampus and the function of calcitonin gene-related peptide in the mechanism of traumatic brain injury accelerating fracture-healing[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(7):1522-1531.

[14] Gu XC, Zhang XB, Hu B, et al. Neuropeptide Y accelerates post-fracture bone healing by promoting osteogenesis of mesenchymal stem cells[J]. Neuropeptides, 2016, 60:61-66. doi: 10.1016/j.npep.2016.09.005.

[15] 章 冲,邓 凯,郭永春,等. 创伤性脑外伤与骨折愈合关系的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2017, 31(7):885-889. doi:10.7507/1002-1892.201612048.

[16] 王 华,姜 未,张晓明,等. 血管活性肠肽对骨关节炎和关节软骨细胞体外培养的影响及其作用机制[J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(4):723-726. doi:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2018.04.038.

[17] 杨亚东,周 娟,唐 文,等. 高选择性神经切断的大鼠骨折愈合过程中血管活性肠肽对微血管密度的影响[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(7):730-734. doi:10.16571/j.cnki.1008-8199.2017.07.011.

[18] Giambartolomei GH, Scian R, Acosta-Rodríguez E, et al. Brucella abortus-infected macrophages modulate T lymphocytes to promote osteoclastogenesis via IL-17[J]. Am J Pathol, 2012, 181(3):887-896. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.05.029.

[19] Choi Y, Arron JR, Townsend MJ, et al. Promising bone-related therapeutic targets for rheumatoid arthritis[J]. Nature Reviews Rheumatology, 2009, 5(10):543-548. doi:10.1038/nrrheum.2009.175.

[20] 高舒妤,朱国宴,郭国宁. 可溶性B7-H3在人脑创伤合并骨折愈合中的表达及意义[J]. 免疫学杂志, 2018, 34(1):54-58. doi:10.13431/j.cnki.immunol.j.20180008.

[21] Morell M, Souza-Moreira L, González-Rey E. VIP in neurological diseases: more than a neuropeptide[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2012, 12(4): 323-332. doi: 10.2174/187153012803832549.

[22] Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions[J]. Amino Acids, 2013, 45(1): 25-39. doi: 10.1007/s00726-011-1184-8.

[23] Huang H, Cheng WX, Hu YP, et al. Relationship between heterotopic ossification and traumatic brain injury: Why severe traumatic brain injury increases the risk of heterotopic ossification[J]. J Orthop Translat, 2018, 12:16-25. doi: 10.1016/j.jot.2017.10.002.

[24] Suto Y, Nagata K, Ahmed SM, et al. Cerebral edema and neurological recovery after traumatic brain injury are worsened if accompanied by a concomitant long bone fracture[J]. J Neurotrauma, 2018. doi: 10.1089/neu.2018.5812.

[25] Suto Y, Nagata K, Ahmed SM, et al. A concomitant bone fracture delays cognitive recovery from traumatic brain injury[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2018, 85(2):275-284. doi: 10.1097/TA.0000000000001957.

(编辑:刘 艺)