

· 基础研究 ·

不同程度大鼠颅脑损伤股骨骨折愈合比较[△]

卜宪敏^{1a}, 池玉磊², 徐英杰^{1b}, 田荣华³, 吴彬^{3*}

(1. 济宁市第一人民医院 a: 病理科; b: 急诊创伤外科, 山东济宁 272067; 2. 菏泽市单县中心医院, 山东菏泽 274399;
3. 济宁医学院附属医院创伤骨科, 山东济宁 272067)

摘要: [目的] 探究大鼠不同程度创伤性颅脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 合并单侧股骨骨折愈合的影响, 以及降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 及骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) /核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 在其中的作用。[方法] 80 只雄性 11 周龄大鼠随机分为 4 组, 每组 20 只, 按照神经功能缺损评分 (neurological severity score, NSS) 标准建立模型, 分为单纯股骨骨折 (无损伤组)、轻度 TBI 合并股骨骨折 (轻度组)、中度 TBI 合并股骨骨折 (中度组)、重度 TBI 合并股骨骨折 (重度组)。比较骨折愈合情况及血清检测结果。[结果] 无损伤组、轻度组、中度组和重度组术后 6 周骨折愈合 X 线评分为 [(1.0±0.7) vs (1.0±0.7) vs (1.8±0.5) vs (1.8±0.5), $P<0.001$], 骨痂体积为 [(418.6±25.7) mm³ vs (414.3±29.6) mm³ vs (689.8±31.2) mm³ vs (681.4±31.8) mm³, $P<0.001$], 其中度组和重度组显著高于无损伤组和轻度组。血清检测方面, 无损伤组、轻度组、中度组和重度组术后 6 周的 CGRP [(10.9±0.9) pg/ml vs (11.1±0.7) pg/ml vs (15.2±0.6) pg/ml vs (15.6±0.5) pg/ml, $P<0.001$]、OPG [(1 131.6±49.9) pg/ml vs (1 180.6±49.3) pg/ml vs (1 443.8±42.3) pg/ml vs (1 457.6±43.8) pg/ml, $P<0.001$]、RANKL [(66.1±6.8) pg/ml vs (68.3±5.4) pg/ml vs (49.5±5.8) pg/ml vs (50.2±6.0) pg/ml, $P<0.001$]、OPG/RANKL [(17.2±1.1) vs (17.3±0.7) vs (29.4±2.7) vs (29.3±2.6), $P<0.001$], 上述指标, 中度组和重度组与无损伤组和轻度组之间差异均有统计学意义。[结论] 中、重度组可以有效促进骨折端骨痂生长, 缩短骨折愈合时间, 这可能与血清中 CGRP 浓度与 OPG/RANKL 表达比值升高有关。

关键词: 创伤性颅脑损伤, 骨折愈合, 降钙素基因相关肽 (CGRP), 骨保护素 (OPG), 核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL)

中图分类号: R683.42 文献标志码: A 文章编号: 1005-8478 (2024) 22-2077-06

Comparison of bone healing of femoral fracture in rats with different extents of craniocerebral injury // BU Xian-min^{1a}, CHI Yu-lei², XU Ying-jie^{1b}, TIAN Rong-hua³, WU Bin³. 1a. Department of Pathology, 1b. Department of Emergency Surgery, The First People's Hospital of Jining City, Jining 272067, Shandong, China; 2. Shanxian Central Hospital, Heze 274399, Shandong, China; 3. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital, Jining Medical University, Jining 272067, Shandong, China

Abstract: [Objective] To investigate the effects of traumatic brain injury (TBI) on unilateral femoral fracture healing in rats in terms of calcitonin gene-related peptide (CGRP), and osteoprotegerin (OPG) / receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL). **[Methods]** A total of 80 11-week-old male rats were randomly divided into 4 groups with 20 rats in each group. A model was established according to neurological severity score (NSS) and the rats were divided into simple femoral fracture (non-injury group) and mild TBI combined with femoral fracture (mild group), moderate TBI with femur fracture (moderate group), and severe TBI with femur fracture (severe group). The data of fracture healing and serum assays were compared. **[Results]** The non-injury group, mild group, moderate and severe group were measured X-ray score [(1.0±0.7) vs (1.0±0.7) vs (1.8±0.5) vs (1.8±0.5), $P<0.001$] and callus volume [(418.6±25.7) mm³ vs (414.3±29.6) mm³ vs (689.8±31.2) mm³ vs (681.4±31.8) mm³, $P<0.001$] 6 weeks after operation, of which the moderate and severe groups were significantly higher than the non-injury and mild groups. Regarding to serum assay, the non-injury group, mild group, moderate group and severe group at 6 weeks after surgery were assayed CGRP [(10.9±0.9) pg/ml vs (11.1±0.7) pg/ml vs (15.2±0.6) pg/ml vs (15.6±0.5) pg/ml, $P<0.001$], OPG [(1 131.6±49.9) pg/ml vs (1 180.6±49.3) pg/ml vs (1 443.8±42.3) pg/ml vs (1 457.6±43.8) pg/ml, $P<0.001$], RANKL [(66.1±6.8) pg/ml vs (68.3±5.4) pg/ml vs (49.5±5.8) pg/ml vs (50.2±6.0) pg/ml, $P<0.001$], OPG/RANKL [(17.2±1.1) vs (17.3±0.7) vs (29.4±2.7) vs (29.3±2.6),

DOI:10.20184/j.cnki.Issn1005-8478.100818

△基金项目: 济宁医学院贺林院士基金项目 (编号: JYHL2018FMS13); 济宁医学院高层次科研项目培育计划项目 (编号: JYGC2021FKJ016); 济宁市重点研发计划基金项目 (编号: 2021YXNS029, 2022YXNS129)

作者简介: 卜宪敏, 副主任医师, 硕士, 研究方向: 临床病理学, (电子信箱) 123637978@qq.com

*** 通信作者:** 吴彬, (电子信箱) wb0902@163.com

$P < 0.001$], with statistically significant differences between moderate and severe groups, and non-injury and mild groups. [Conclusion] Moderate and severe TBI do effectively promote callus growth and shorten fracture healing time, which may be related to the increase of serum CGRP concentration and OPG/RANKL expression ratio.

Key words: traumatic brain injury, fracture healing, calcitonin gene-related peptide (CGRP), osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)

创伤性颅脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 合并四肢骨折是常见的严重多发伤之一, 目前 TBI 后骨折部位骨痂过度生长、骨折愈合加快现象在临床中已被广泛认知^[1]。1968 年 Robert 首次报道 TBI 和长期昏迷患者伴有骨折部位大量骨痂形成; 而后有研究证实, 合并 TBI 能够加速长骨骨折愈合的现象^[2, 3]。有研究发现, TBI 时血脑屏障渗透性增加, 同时与骨折愈合相关的神经因子表达会明显升高, 这些升高的神经因子可以通过损伤的血脑屏障渗透到体液循环中, 并通过体液循环运送到损伤部位, 从而导致异位骨化、促进骨折愈合^[4]。另外, 支配骨组织的神经中富含多种神经肽和激素, 能够促进骨骼的形成、发育和修复^[5]。其中以降钙素基因相关肽受体 (calcitonin gene-related peptide receptors, CGRP) 表达为核心的临床研究是当前创伤性颅脑损伤后促进骨折愈合机制的研究热点之一。CGRP 是一种在感觉神经元中含量丰富的神经肽, 且可以通过上调成骨细胞活性并下调破骨细胞活性, 促进骨组织修复重建^[6]。Zhang 等^[7]研究发现, 与单纯骨折相比, TBI 合并骨折时机体 CGRP 的表达会升高。Xu 等^[8]报道 TBI 诱导的 CGRP 在脑组织中可以通过自分泌或旁分泌等方式保护损伤的脑组织, 并且在 TBI 后, 脑脊液及血清中的神经生长因子和 CGRP 能够促进骨折愈合。骨折缺氧炎症反应微环境中 CGRP 过表达是加速骨折愈合的关键, 其可能与骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) / NF- κ B 受体激活剂配体 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) 通路相关。但是目前关于不同程度 TBI 对 CGRP 分泌量、OPG/RANKL 系统表达变化以及对骨折愈合过程的影响, 相关研究较少。因此, 本研究通过分析大鼠不同程度 TBI 合并股骨骨折模型中 CGRP、OPG/RANKL 系统的表达变化, 探讨不同程度 TBI 对骨折愈合的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂

雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠购自济南朋悦实验动物繁育有限公司 [生产许可证号 SCXK (鲁)

20220006]; 10%福尔马林中性固定液购自南昌雨露实验器材; 苏木素-伊红染色液购自无锡市江源实业公司; EDTA 脱钙液购自 Solarbio 公司; CGRP ELISA 试剂盒、OPG ELISA 试剂盒、RANKL ELISA 试剂盒购自武汉华美生物。

1.2 动物分组

80 只 11 周龄雄性大鼠, 体重 (275 \pm 25) g, 饲养温度 26 $^{\circ}$ C, 湿度 50%, 随机分为 4 组, 每组 20 只大鼠, 根据颅脑损伤程度建造不同程度 TBI 模型, 无损伤组: 单纯股骨骨折; 轻度组: 轻度 TBI 合并股骨骨折; 中度组: 中度 TBI 合并股骨骨折; 重度组: 重度 TBI 合并股骨骨折。模型制作后 3、6 周两个时间点处死动物取材, 每组 10 只。该研究已通过济宁医学院附属医院科学研究伦理委员会批准, 编号: 2021B115。

1.3 颅脑损伤模型的建立

不同程度 TBI 模型建造参考 Foda 等^[9]设计的冲击加速度系统。大鼠术前 4 h 禁食, 腹腔注射戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 全麻, 俯卧位, 头皮正中切口, 将直径 1 cm 的圆形丙烯酸树脂固定在大鼠颅骨穹窿的中央, 大鼠头部置于有机玻璃管正下方。分别选用 50、150、250 g 砝码, 距大鼠头部 1 m 高度自由落下, 砝码撞击头部后消毒缝合, 术后 6 h 运用 NSS 评分评估颅脑损伤的典型神经学表现。神经功能评分 0~18 分 (正常评分 0 分; 轻度损伤评分 1~6 分; 中度损伤评分 7~12 分; 重度损伤评分 13~18 分)。

1.4 股骨骨折模型建立

取大腿外侧纵向切口, 显露股骨, 于股骨中段剪断, 经左侧髌骨旁切口进入关节囊, 将直径 1.2 mm 的克氏针置入髓腔, 进行股骨复位固定, 消毒缝合。术后 6 h 自由饮食, 术后连续 3 d 肌肉注射克林霉素 (20 mg/kg) 抗炎、盐酸曲马多 (1 mg/kg) 镇痛。

1.5 取材与检测方法

1.5.1 X 线检测与评分

实验动物分别于术后 3、6 周拍摄术侧股骨 X 线片, 观察各组骨折线及骨痂生长情况, 采用 Goldberg 等^[10]的方法对骨折愈合进行评分: 影像学未愈合为 0 分; 部分愈合为 1 分; 完全愈合为 2 分。

1.5.2 骨痂测量

取大鼠左侧股骨，游标卡尺测量， r_1 为股骨的直径， r_2 为骨痂的直径， L 为骨痂的长度，采用公式 $V=2\pi r_1(r_2-r_1)L$ 估算骨痂体积^[11]。

1.5.3 组织学染色

大鼠股骨置于 10% 福尔马林中性固定剂中固定，16 h 后 pH 7.2 EDTA 脱钙液中脱钙 8 h，石蜡包埋，组织切片后置于二甲苯 I、II、III 溶液中各浸泡 5 min 脱蜡；浓度梯度乙醇（100%、95%、85%、75%）脱水；苏木素 5 min；1% 盐酸酒精分化 10 s，随后进行蒸馏水缓慢冲洗 2 min；伊红复染 3 min；依次置入不同浓度乙醇（浓度梯度 75%、85%、95%、100%）各 1 min；二甲苯 I、II 各 5 min；中性树胶封片，显微镜观察。

1.5.4 血清检测

大鼠全麻，取心脏血约 2 ml。4°C，1 000 g 离心 15 min，取上清，用 ELISA 免疫试剂盒进行检测：取 96 孔板分别设标准品孔、待测样本孔。每孔分别加标准品或待测样本 100 μ l，混匀，覆上板贴，37°C 放置 120 min；弃液，甩干；每孔加生物素标记抗体工作液 100 μ l，覆板贴，37°C，60 min；弃液，甩干，洗板；每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液 100 μ l，覆板贴，37°C，60 min；弃液，甩干，洗板；依序每孔加底物溶液 90 μ l，37°C 避光显色 20 min；依序每孔加终止溶液 50 μ l，终止反应；5 min 内用酶标仪在 450 nm 波长依序测量各孔的光密度（OD 值）。分别检测 CGRP、OPG 和 RANKL，计算 OPG/RANKL 比值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 28.0 软件和 Graph Pad Prism 8.0 软件进行数据统计学分析，计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间均数比较采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 颅脑损伤 HE 表现

大鼠颅脑损伤 3 d 后顶叶区脑组织 HE 染色结果显示：无损伤组中神经元分布规则，结构完整。轻度组可见点状轻度水肿，神经元分布较为规整；中度组可见片状水肿，神经元分布较为紊乱；重度组可见大片水肿，神经元分布紊乱，正态分布的神经元较少。

2.2 X 线片结果

术后第 3 周，X 线片示无损伤组和轻度组骨痂生

成较少，部分愈合，仍可见部分骨折线。中、重度组骨痂明显增多，骨折线已模糊，骨折基本愈合；术后第 6 周，轻度组和无损伤组仍是部分愈合，骨折线模糊。中、重度组骨折线已消失，骨折已愈合。骨折愈合 X 线评分见表 1，术后 3、6 周，中、重度组骨折愈合评分显著高于无损伤组和轻度组 ($P < 0.05$)，而轻度组与无损伤组相比骨折愈合评分的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 术后骨痂体积

骨痂体积测量结果见表 1。与术后 3 周相比，术后 6 周 4 组骨痂生成量均显著增加 ($P < 0.05$)，术后第 3、6 周，中、重度组骨痂生成量显著高于无损伤组和轻度组 ($P < 0.05$)；而无损伤组与轻度组骨痂生成量的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 术后骨痂 HE 表现

骨折术后 3 周，骨痂经 HE 染色结果示：无损伤组和轻度组骨痂含量较中、重度组少，肥大的软骨细胞增多，骨小梁不规则，可见局部愈合缺损（图 1a~1d）；中、重度组新生骨痂多，有较多形状规则的骨小梁，少量编织骨生成。骨折术后第 6 周，相比较无损伤组和轻度组，中、重度组成熟骨小梁数量增多，可见较多编织骨和板层骨形成（图 1e~1h）。

2.5 血清检测结果

血清检测结果见表 1，与术后 3 周相比，术后 6 周，4 组大鼠血清 CGRP、OPG、RANKL、OPG/RANKL 的比值均无显著变化 ($P > 0.05$)，术后第 3、6 周，中、重度组大鼠血清中 CGRP 和 OPG 的浓度及 OPG/RANKL 的比值显著高于无损伤组和轻度组 ($P < 0.05$)，而 RANKL 的浓度显著低于无损伤组和轻度组 ($P < 0.05$)；中度组与重度组血清中 CGRP、OPG 及 RANKL 的浓度的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

TBI 是指由外力作用引起的创伤性结构损伤或脑功能障碍，其合并肢体骨折是神经外科和骨科的常见多发伤^[12]。研究表明，相比较单纯骨折患者，骨折合并颅脑损伤后的骨痂生长速度更快、骨折愈合率更高^[13]。

CGRP 是 Rosenfeld 于 1983 年通过 DNA 重组和分子生物学技术发现的几种具有生物活性的神经肽之一。CGRP 由降钙素基因编码，包含 5 个片段的插入序列和 6 个片段的外显子，在不同的组织中进行重组

可以呈现出不同的产物^[14]，CGRP 是神经系统影响骨组织新陈代谢的重要桥梁递质，其广泛分布于骨骼的感觉神经元中，能够调节骨骼重建的完整性^[15]。当支配骨骼的感觉神经元在传导热、机械疼痛以及化学刺激信号时，周围神经末梢可以分泌多种神经递质，而 CGRP 是周围神经含量最多的一种神经肽，

其在骨修复及重建过程中具有重要作用^[16]。Song 等^[17]报道，TBI 合并骨折后的骨折愈合时间和矿化早于单纯骨折组，并且证明在颅脑损伤后 CGRP 可以通过受损的血脑屏障进入血液，协同周围神经分泌的 CGRP 一起加速骨折愈合。

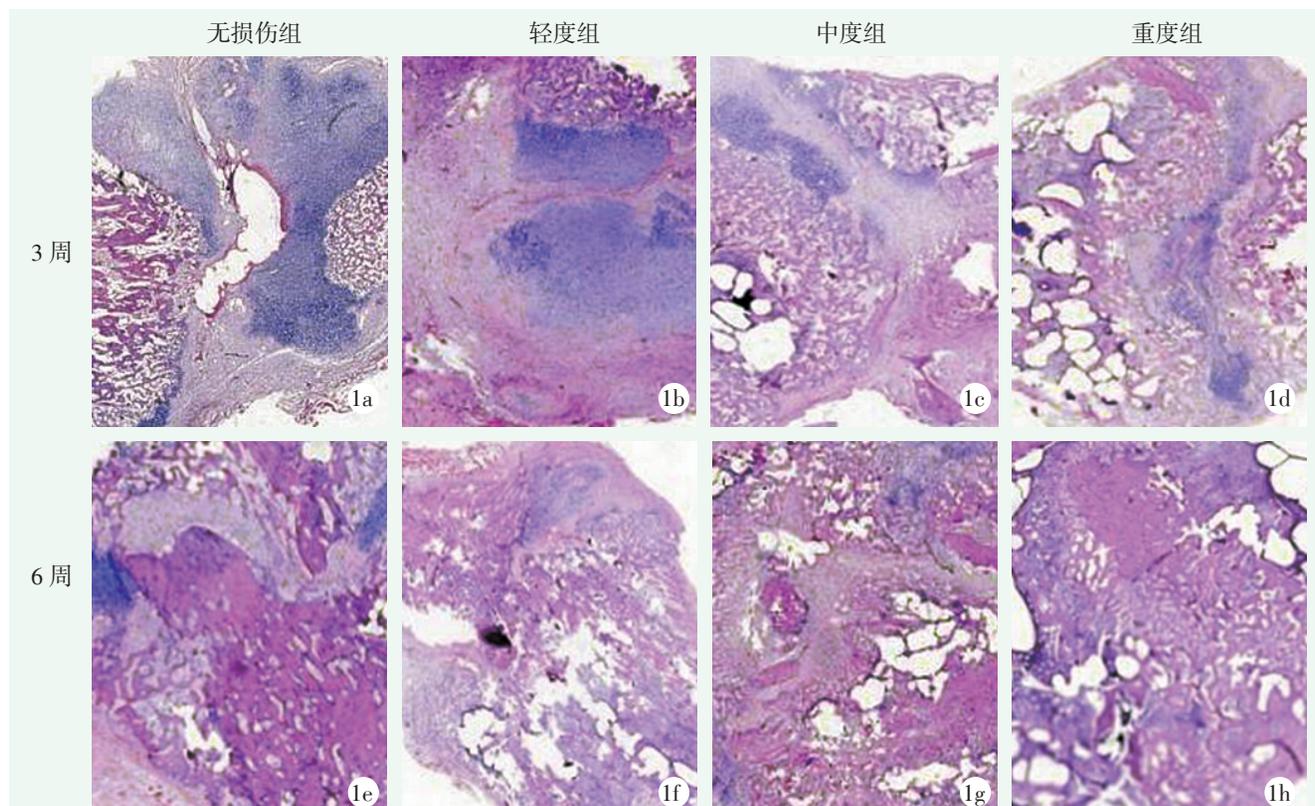


图 1. 4 组大鼠术后 3、6 周骨痂组织学表现 (HE 染色, $\times 40$)。1a: 术后 3 周无损伤组; 1b: 术后 3 周轻度组; 1c: 术后 3 周中度组; 1d: 术后 3 周重度组; 1e: 术后 6 周无损伤组; 1f: 术后 6 周轻度组; 1g: 术后 6 周中度组; 1h: 术后 6 周重度组。
Figure 1. Histological finding in the 4 groups (HE, $\times 40$). 1a: No injury group 3 weeks after operation; 1b: Mild group 3 weeks after operation; 1c: Moderate group 3 weeks after operation; 1d: Severe group 3 weeks after operation; 1e: No injury group 6 weeks after operation; 1f: Mild group 6 weeks after operation; 1g: Moderate group 6 weeks after operation; 1h: Severe group 6 weeks after operation.

本研究发现创伤术后第 3 周，中、重度组大鼠血清中 CGRP 的浓度显著高于无损伤组 ($P < 0.05$)。而轻度组与无损伤组血清中 CGRP 的浓度相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这表明 CGRP 作为神经系统分泌的一种神经肽，当受到中、重度 TBI 后其表达量增加，起到保护大脑的作用。同时 TBI 后血脑屏障的完整性遭到破坏，脑脊液中的 CGRP 可能通过血脑屏障进入体液循环，进而导致血清中 CGRP 含量升高。同时作者认为轻度 TBI 时难以诱导大脑神经系统内 CGRP 的表达。

骨形成和骨吸收通常处于动态平衡状态，此过程亦被称为骨转换^[18]。OPG/RANKL 系统在骨重建与骨折修复过程中起重要作用，它们能够调节破骨细胞的

活性，在成骨细胞和破骨细胞之间的转换之间发挥关键作用^[19]。OPG 是一种在成骨细胞/基质细胞中自然表达的具有潜在破骨细胞生成抑制活性的蛋白质。RANKL 由成骨细胞/基质细胞产生，是一种能与 RANK 结合的跨膜配体。RANK 与 RANKL 相互作用可启动基因表达和信号级联反应，导致破骨细胞前体细胞分化为成熟破骨细胞。OPG 作为诱饵受体与 RANK 竞争性结合，阻止 RANK 与 RANKL 结合，进而抑制破骨细胞分化^[20]。研究表明，CGRP 可以抑制 RANKL 诱导的破骨细胞前体细胞中 NF- κ B 的激活，显著抑制 RANKL 介导的破骨细胞生成，从而抑制骨吸收^[21]。Wang 等利用体外实验证实，CGRP 诱导 BMSCs 向成熟的成骨细胞分化，并抑制 RANKL

诱导的 BMMs 激活 NF-κB, 从而抑制破骨细胞分化和骨吸收^[11]。另外, RANKL 和 OPG 是直接调节破骨细胞分化和骨吸收的配体-受体系统的成员, 各种

神经肽类物质、激素、生长因子和细胞因子等都可以通过对骨细胞和 OPG / RANKL 系统的直接作用调节骨代谢^[22]。

表 1. 4 组大鼠检测结果比较

Table 1. Comparison of detection results among the 4 groups

指标	无损伤组 (n=10)	轻度组 (n=10)	中度组 (n=10)	重度组 (n=10)	P 值
骨痂评估					
X 线评分 (分, $\bar{x} \pm s$)					
3 周	0.4±0.6	0.6±0.6	1.6±0.6	1.4±0.6	<0.001
6 周	1.0±0.7	1.0±0.7	1.8±0.5	1.8±0.5	<0.001
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
骨痂体积 (mm ³ , $\bar{x} \pm s$)					
3 周	287.3±28.8	302.3±21.6	411.4±27.8	419.0±22.6	<0.001
6 周	418.6±25.7	414.3±29.6	689.8±31.2	681.4±31.8	<0.001
P 值	<0.001	0.005	<0.001	<0.001	
血清检测					
CGRP (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)					
3 周	11.1±0.6	10.9±0.9	16.3±0.6	16.7±0.7	<0.001
6 周	10.9±0.9	11.1±0.7	15.2±0.6	15.6±0.5	<0.001
P 值	0.844	0.198	0.143	0.110	
OPG (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)					
3 周	1 254.2±62.4	1 238.3±63.0	1 538.0±52.1	1 550.0±54.2	<0.001
6 周	1 131.6±49.9	1 180.6±49.3	1 443.8±42.3	1 457.6±43.8	<0.001
P 值	0.276	0.837	0.089	0.077	
RANKL (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)					
3 周	61.3±5.8	62.5±6.6	42.5±6.8	41.0±5.5	<0.001
6 周	66.1±6.8	68.3±5.4	49.5±5.8	50.2±6.0	<0.001
P 值	0.372	0.766	0.092	0.068	
OPG/RANKL					
3 周	20.5±1.0	19.9±1.2	36.8±5.1	38.2±3.8	<0.001
6 周	17.2±1.1	17.3±0.7	29.4±2.7	29.3±2.6	<0.001
P 值	0.723	0.287	0.295	0.084	

本研究发现, 中、重度组大鼠血清中 OPG/RANKL 的比值较无损伤组明显增高, 而轻度组与无损伤组血清中 OPG 和 RANKL 的表达变化差异无统计学意义 ($P>0.05$), 在第 3、6 周, 中、重度组生成的骨痂体积比无损伤组和轻度组生成的骨痂体积明显增多, 其骨折愈合时间较快, HE 染色中骨小梁和编织骨较无损伤组和轻度组数量和数量要多且较为规整。因此笔者认为中、重度 TBI 可以促进骨折愈合, 其机制可能与颅脑损伤后大鼠血清中 CGRP 及 OPG/RANKL 系统的动态变化有关, 血清中 CGRP 的增多调控 OPG/RANKL 浓度比值升高, 进而抑制破骨细胞的增

殖分化, 促进骨痂的形成, 加速骨折愈合进程。

综上所述, 本研究发现, 轻度 TBI 可能无法有效诱导大脑神经系统中 CGRP 的合成, 对骨折愈合过程影响较小; 然而中、重度 TBI 后血清中 CGRP 浓度显著提高, 且骨折端骨痂体积明显增大, 骨折愈合时间缩短, 其机制可能与血脑屏障受损、OPG/RANKL 系统表达变化相关。

参考文献

- [1] Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D, et al. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury [J]. Nat Rev

- Neurol, 2010, 6 (7) : 393–403. DOI: 10.1038/nrneurol.2010.74.
- [2] Newman RJ, Stone MH, Mukherjee SK. Accelerated fracture union in association with severe head injury [J]. *Injury*, 1987, 18 (4) : 241–246. DOI: 10.1016/0020-1383(87)90006-4.
- [3] Perkins R, Skirving AP. Callus formation and the rate of healing of femoral fractures in patients with head injuries [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1987, 69 (4) : 521–524. DOI: 10.1302/0301-620X.69B4.3611150.
- [4] 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.
- [5] 李世伟, 唐学阳, 刘利君. 脑外伤促进骨折局部骨痂快速形成机制的研究进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2016, 24 (22) : 2069–2073. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2016.22.13.
- Li SW, Tang XY, Liu LJ. Accelerated callus formation in fracture healing after brain trauma [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2016, 24 (22) : 2069–2073. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2016.22.13.
- [6] Onuoha GN. Circulating sensory peptide levels within 24 h of human bone fracture [J]. *Peptides*, 2001, 22 (7) : 1107–1110. DOI: 10.1016/S0196-9781(01)00434-X.
- [7] Zhang D, Zhang P, Wang Y, et al. The influence of brain injury or peripheral nerve injury on calcitonin gene-related peptide concentration variation and fractures healing process [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2009, 37 (2) : 85–91. DOI: 10.1080/10731190902743149.
- [8] Xu YQ, Qin ML, Feng SY, et al. Expressions and significance of calcitonin gene-related peptide and nerve growth factor in rabbit model of traumatic brain injury complicated with tibial fracture: preliminary results [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23 (12) : 5040–5050. DOI: 10.26355/eurev_201906_18167.
- [9] Foda MA, Marmarou A. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization [J]. *J Neurosurg*, 1994, 80 (2) : 301–313. DOI: 10.3171/jns.1994.80.2.0301.
- [10] Bjurholm A, Kreicbergs A, Brodin E, et al. Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone [J]. *Peptides*, 1988, 9 (1) : 165–171. DOI: 10.1016/0196-9781(88)90023-X.
- [11] Perkins R, Skirving AP. Callus formation and the rate of healing of femoral fractures in patients with head injuries [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1987, 69 (4) : 521–524. DOI: 10.1302/0301-620X.69B4.3611150.
- [12] Medeiros M, de Mello Alves Rodrigues AC, Alves MR, et al. Bibliometrics of CNS & neurological disorders – drug targets: an international evolution along time [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2019, 18 (3) : 239–244. DOI: 10.2174/1871527318666181227123924.
- [13] 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.
- [14] Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, et al. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing [J]. *Nature*, 1983, 304 (5922) : 129–135. DOI: 10.1038/304129a0.
- [15] Wang L, Shi X, Zhao R, et al. Calcitonin-gene-related peptide stimulates stromal cell osteogenic differentiation and inhibits RANKL induced NF- κ B activation, osteoclastogenesis and bone resorption [J]. *Bone*, 2010, 46 (5) : 1369–1379. DOI: 10.1016/j.bone.2009.11.029.
- [16] 周健, 陀泳华, 夏立恒, 等. 降钙素基因相关肽通过 ERK1/2 信号通路对人血管内皮细胞增殖的影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2013, 21 (6) : 608–612. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2013.06.18.
- Zhou J, Tuo YH, Xia LH, et al. Calcitonin gene-related peptide increases of human umbilical vein endothelial cells by ERK1/2 pathway [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2013, 21 (6) : 608–612. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2013.06.18.
- [17] Song Y, Bi L, Zhang Z, et al. Increased levels of calcitonin gene-related peptide in serum accelerate fracture healing following traumatic brain injury [J]. *Mol Med Rep*. 2012, 5 (2) : 432–8. DOI: 10.3892/mmr.2011.645.
- [18] Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, et al. Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease [J]. *Curr Rev Musculoskelet Med*, 2009, 2 (1) : 56–64. DOI: 10.1007/s12178-009-9046-7.
- [19] Marchelli D, Piodi LP, Corradini C, et al. Increased serum OPG in atrophic nonunion shaft fractures [J]. *J Orthop Traumatol*, 2009, 10 (2) : 55–58. DOI: 10.1007/s10195-009-0047-5.
- [20] Wang J, He M, Wang G, et al. Organic gallium treatment improves osteoporotic fracture healing through affecting the OPG/RANKL ratio and expression of serum inflammatory cytokines in ovariectomized rats [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2018, 183 (2) : 270–279. DOI: 10.1007/s12011-017-1123-y.
- [21] Ishizuka K, Hirukawa K, Nakamura H, et al. Inhibitory effect of CGRP on osteoclast formation by mouse bone marrow cells treated with isoproterenol [J]. *Neurosci Lett*, 2005, 379 (1) : 47–51. DOI: 10.1016/j.neulet.2004.12.046.
- [22] 王键, 魏劲松, 龚颜, 等. 鲑鱼降钙素对去卵巢大鼠骨髓细胞 OPG、RANKL 基因和蛋白表达的影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2013, 21 (7) : 701–707. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2013.07.14.
- Wang J, Wei JS, Gong Y, et al. Effects of salmon calcitonin on gene and protein expression of OPG and RANKL in bone marrow cells from ovariectomized rats [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2013, 21 (7) : 701–707. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2013.07.14.

(收稿:2023-11-10 修回:2024-06-28)

(同行评议专家: 陈锋, 王伟, 朱庄臣)

(本文编辑: 宁桦)