

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520131153505

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

骨折合并脑外伤时 IL-10 对骨折愈合的影响

Effect of IL-10 in rats with Fracture Associated with

Cerebral Trauma on Bone Fracture Healing

李 腾

指导教师姓名: 练克俭 教授

专 业 名 称: 外科学 (骨科学)

论文提交日期: 2016 年 5 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 05 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的：评估脑外伤合并骨折后血清 IL-10、TNF- α 的含量，IL-10 是否对骨折的愈合有促进作用，从而评价脑外伤促进骨折愈合与血清中高 IL-10 的关系。

方法：选取 120 只 3 月龄 SD 雄性大鼠，体重为 195-210g。按照随机数字表法，分为 4 组，每组 30 只，分别作以下处理：A 组：脑外伤合并股骨骨折组；B 组：单纯脑外伤组；C 组：单纯股骨骨折组，腹腔注射 IL-10 蛋白（10 μ g/kg \cdot d）；D 组：单纯股骨骨折组，腹腔注射 PBS 溶液（1ml）。连续 6 周观察 A 组和 B 组大鼠一般情况，并评估颅脑损伤程度。伤后第 6 小时、第 24 小时和第 48 小时，ELISA 法测定 A 组和 B 组血清中 IL-10、TNF- α 的含量。术后第 1 天、4 天、7 天和 14 天，检测 C 组和 D 组肝肾功指标。术后第 2 周、4 周和 6 周，行 C 组和 D 组侧位 X 线检查，计算骨痂体积，并于骨折断端附近取骨痂组织，行 HE 染色、Masson 染色、免疫组化检测。所有的统计数据均用平均值 \pm 标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，统计学检验用 t 检验，统计学数据应用 IBM SPSS 19.0 计算， $P<0.05$ 记为有统计学差异。

结果：1.NSS 评分：伤后第 6 小时最高，平均评分为 11.01 \pm 1.82（满分为 25 分），后逐渐降低，1 个月后颅脑损伤的功能开始恢复。2.血清 IL-10 含量：术后第 6 小时、24 小时和 48 小时，A 组高于 B 组和 D 组，B 组高于 D 组， $P<0.05$ ，且三组 IL-10 都在伤后第 24 小时达到峰值。3.血清 TNF- α 含量：术后第 6 小时、24 小时和 48 小时，A 组高于 B 组和 D 组， $P<0.05$ ，B 组与 D 组没有明显差异。4.X 线测量骨痂体积：C 组和 D 组术后第 2 周、4 周和 6 周，同一时间，C 组骨痂体积均比 D 组骨痂体积大。5.肝肾功指标：C 组和 D 组在术后第 1 天和第 4 天，肝肾功指标均高于正常，至第 7 天，肝肾功指标开始回归正常范围内，两组大鼠的肝肾功指标没有统计学差异。6.组织学检查：C 组在术后第 2 周、4 周和 6 周，成纤维细胞和软骨细胞数目及胶原蛋白的含量均高于 D 组， $P<0.05$ 。

结论：本实验提示脑外伤合并骨折实验动物模型在创伤后 IL-10 和 TNF- α 的含量均增高；连续腹腔注射 IL-10，可以促进股骨骨折周围骨痂体积增加，脑外伤促进骨折愈合可能与血清中 IL-10 的含量增高相关。

关键词：脑外伤；股骨骨折；IL-10

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Objects: To evaluate the serum IL-10 and TNF- α after trauma brain injury combined fracture. IL - 10 whether have a promoting effect on the healing of bone fracture.

Methods: 120 3-month-old male SD rats (weight 195-210g) were randomly divided into 4 groups according to random number table. Each group has 30 rats. They were dealt with the 4 methods as follows: Group A: trauma brain injury combined femoral fracture; Group B: trauma brain injury singly; Group C: the right femoral fracture with injecting IL-10 (10 μ g/Kg•d) in 2 weeks; Group D: the right femoral fracture with injecting PBS (1ml) in 2 weeks. At the 6th hour, 24th hour and 48th hour post-injury, rats of Group C and Group D were determined the IL-10 and TNF- α levels in the serum by ELISA method. At the 1st day, 4th day, 7th day and 14th day postoperative, liver and kidney function indexes were examined of Group C and Group D. At the 2^{ed} week, 4th week, 6th week postoperative, X-rays were necessary took of rats from Group C and Group D to evaluate the bone callus volume, what's more, we also fetched the tissue near the fracture fragments to HE dyed, Masson stain and immunohistochemical examination. All of the statistical datas are expressed as mean \pm standard deviation ($\bar{x} \pm s$). T test was used to analysis the data. Using IBM SPSS 19.0 software to data analysis. P<0.05 as a statistically significant defference.

Results: 1. NSS score: at the 6th hour, the score reached the peak and the average score was 11.01 \pm 1.82. Gradually the function of the trauma brain injury recovery to normal after 1 month. 2.The contents of IL-10: At the 6th hour,24th hour and 48th hour post-injury, the contents of IL-10 in Group A was higher than in Group B and Group D, and it was higher in Group B than in Group D,P<0.05. 3. The contents of TNF- α : At the 6th hour, 24th hour and 48th hour post-injury, the contents of TNF- α in Group A was higher than in Group B and Group D, P<0.05, however, it was no difference between Group B and Group D. 4.The callus on X-rays: at the 2ed week, 4th week and

6th week, the bone callus's volume in Group C was larger than in Group D, $P < 0.05$. 5. At the 1st day and 4th day postoperative, the liver and kidney function indexes were higher than normal. While at the 7th day, the indexes had returned to normal in Group C and Group D. 6. Histological examination: Fibroblast cells and cartilage cells and collagen protein contents in Group C were higher than in Group D at the 2^{ed} week, 4th week and 6th week, $P < 0.05$.

Conclusion: This study suggests that the contents of IL-10 and TNF- α in serum were increased in the experimental animal models of trauma brain injury with fracture. And successive intraperitoneal injection of IL-10 can promote callus volume be more around the femoral fracture fragments. What's more, promoting fracture healing by traumatic brain injury may be associated with high content of IL-10 in serum.

Key words: Trauma brain injury; Femoral fractures; IL-10

目 录

摘 要	I
Abstract	III
目 录	X
缩略词	X
第一章	1
前 言	1
第二章 脑外伤合并骨折大鼠血清 IL-10、TNF- α 测定	6
2.1 材料与试剂	6
2.2 方法	7
2.3 结 果	9
第三章 IL-10 在大鼠股骨骨折愈合的作用	12
3.1 材料与试剂	12
3.2 方法	13
3.3 结 果	18
3.4 讨 论	27
3.5 结 论	31
参 考 文 献	32
附 录	39
综 述	42
参 考 文 献	46

个人简历与研究成果..... 50

致 谢 52

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Contents	X
Abbreviations	XI
Chapter 1	1
Introduction.....	1
Chapter 2 Tests of serum of IL-10, TNF-α of rats supplied with trauma brain injury combined fracture	6
2.1 Apparatus and Materials	6
2.2 Methods.....	7
2.3 Results.....	9
Chapter 3 Preliminary experimental study on the effect of IL-10 on fracture healing	12
3.1 Apparatus and Materials	12
3.2 Methods.....	13
3.3 Results.....	18
3.4 Discussion	27
3.5 onclusion.....	31
References	32
Appendix	39

Overview	42
References	46
Publications and Rewards	50
Acknowledgements	52

厦门大学博硕士论文摘要库

缩略词

英文缩写	英文全称	中文全称
IL-10	interleukin-10	白介素-10
TNF- α	tumor necrosis factor- α	肿瘤坏死因子- α
PBS	phosphate buffer	磷酸盐缓冲液
HE	hematoxylin-eosin	苏木精-伊红
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
NSS	neurological severity score	脑损伤严重程度评分
BMPs	bone morphogenetic proteins	骨形态发生蛋白
FGF-2	fibroblast growth factor-2	成纤维细胞生长因子-2
PTH	parathyroid hormone	甲状旁腺激素
TGF- β	transforming growth factor- β	转化生长因子- β
PDGF	platelet derived growth factor	血小板衍生生长因子
PDGF-BB	Platelet-derived Growth Factor-BB	血小板衍生生长因子-BB
IFN- γ	interferon- γ	干扰素- γ
OPG	osteoprotegerin	骨保护素
NFATc1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1	活化 T 细胞核因子-胞浆 1
4-IBBL	4-1BB ligand	4-1BB 配体
TBM	tetramethylbenzidine	四甲基联苯胺
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
SABC	streptAvidin—biotin complex	链霉亲和素—生物素 复合物
ALT	alanine aminotransferase	谷丙转氨酶
AST	aspartate transaminase	谷草转氨酶
MHC	major histocompatibility complex	主要组织相容性复合体
HMGB1	high mobility group box-1 protein	高迁移率族蛋白 1
RANKL	receptor activator for nuclear factor- κ B	核因子 κ B 受体活化因子配体

	ligand	
英文缩写	英文全称	中文全称
Runx2	runt-related transcription factor 2	Runt 相关转录因子 2
Ihh	Indian hedgehog	印度刺猬因子
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand	肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章

前言

研究背景：在临床工作中，我们经常遇到多发伤的患者，这其中就包含了很多脑外伤合并骨折的患者^[1-3]，由于神经系统的原因，暂时无法完成骨折的修复手术，病情稳定后，常规行 X 线检查，会发现，骨折端已经有大量的新鲜骨痂形成，甚至在肌肉中出现异位骨化，骨折愈合的速度明显加快，但是截止到目前，其发生的机制仍然让我们充满好奇，即便是越来越多的学者和医师参与此机制的研究^[4-7]。另外，在临床工作中，骨折延迟愈合或者不愈合一直是一个棘手的问题，尽管现在的技术手段不断地提高，仍然有 5% 的骨折延迟愈合或者不愈合的发生率^[8, 9]。尤其是现阶段的医疗大环境，寻找更多降低骨折延迟愈合或者不愈合的发生率的方法，显得尤为重要。

1. 骨折愈合的生理过程

骨折愈合和骨修复是一种模仿胚胎时期中的骨骼肌系统发生的一种过程^[10]。概括来说，这些胚胎时期发生的再生过程，是真实可再生，并且可以修复的骨骼系统，可以恢复至伤前的细胞组分，以及大体结构和功能。一项研究^[11]提示：大鼠骨折愈合的 21 天内的骨痂中的转录组序列，竟然有三分之一的大鼠同组基因与之前诱导的人类的胚胎干细胞中也能表达。也有很多调节四肢结构的同组基因在骨折愈合的过程中高表达。最终，所有参与胚胎骨骼系统的形态基因均在骨痂中表达。这从另一方面提示骨折愈合的发生机制。

传统意义上，骨折愈合的过程可以分为三个阶段：①、血肿炎性激化阶段：骨折发生之后，骨折断端及其周围的软组织形成血肿，由于骨折周围软组织部分坏死、骨组织坏死，导致局部发生无菌性炎症反应，各种炎性细胞（单核细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞等）侵入并聚集于血肿中，逐步清除坏死组织，从而使血肿逐渐机化并形成肉芽组织。肉芽组织内的成纤维细胞合成并分泌大量的胶原纤维蛋白，转化为纤维结缔组织，使骨折断端连接起来。这一阶段大约可持续 2 周时间。②、原始骨痂形成阶段：骨外膜和骨内膜下成骨，分别形成外骨痂和内骨痂，由软骨基质钙化（软骨内成骨）的骨痂连接，形成桥梁骨痂，标志

着原始骨痂形成，当这些骨痂足以抵抗肌收缩、剪力和旋转力时，达到骨折的临床愈合，这个阶段一般可持续 4-8 周的时间。③、骨板形成塑形阶段：这个阶段，新生的骨小梁不断增粗，排列逐渐规则和致密，原始骨痂逐渐被板层骨替代，使骨折断端部位由桥梁骨痂变成坚韧骨性连接，骨折断端的强度和刚度达到正常骨的性能，这个阶段大约需要 8-12 周的时间。

目前，骨折愈合的发生过程研究的更为深入，在上述三个阶段中，每个阶段的发生过程描述的也更为精细和精确。骨折愈合和骨组织修复都涉及到一个最原始的合成代谢反应，即干细胞的重新补充和分化成骨骼和血管组织。这些组织填充至骨折两端之后，软骨骨痂即将形成，这时骨膜继续膨胀^[12]，形成原始骨痂。与此同时^[13, 14]，肌肉间隙中将会形成可以分化为血管组织的细胞，为新生骨组织提供营养。随着慢性分化的过程，软骨细胞外基质开始矿化，骨折愈合的合成阶段逐渐结束^[15, 16]。随后，主导骨折愈合过程的则变成了分解代谢。在这个阶段，会出现软骨骨痂的吸收，并会出现一些其他的特殊的分解代谢反应。即便是软骨被吸收，但是继发性骨形成已经开始，并且原始的血管形成并没有因此而停止。最终，骨折愈合进入骨板塑形期，最初形成的矿化基质被破骨细胞所吸收，继而填充至软骨吸收区的继发性骨组织也被吸收。随着骨痂组织的吸收，骨折愈合的过程也随之结束，此时，成骨细胞和破骨细胞的进入一个平衡的状态，并且，骨髓腔再通，造血组织和骨组织恢复至伤前的水平。同时^[17, 18]，在最后一个分解代谢的阶段，过多的以及高流速的血管也开始恢复至伤前的水平。

2. 影响骨折愈合的一些因素

在骨折修复的过程中，经历的多个阶段，不仅受到机体大环境以及周围微环境的多层面、多途径的调节，而且也受到不同生长因子、炎症因子、细胞因子的参与，是骨折愈合的基础条件。骨折愈合和软骨内成骨均直接接受 BMPs、FGF-2、hedgehog 蛋白、PTH、PTH 相关蛋白、TGF- β 、Wnt 蛋白和 Wnt 拮抗剂调控^[19-26]。当然还有一些其他间接调控的因子。这些因素既包括局部因素，也包含全身因素。①、局部因素：(1)、FGF-2:Kawaguchi 等人^[27]研究发现使用重组人 FGF-2 促进胫骨干骨折愈合。他将 70 例胫骨干骨折的患者随机分为 3 组，分别在骨折端注射安慰剂、低剂量（0.8mg）和高剂量（2.4mg）的 FGF-2 凝胶，观察 24 周后发现，影像学上，低剂量组和高剂量组之间没有差异，而比安慰组骨

愈合率高。(2)、PDGF: DiGiovann 等^[28]使用重组人 PDGF-BB 与自体骨移植治疗足踝关节融合术, 研究发现, PDGF 组与自体骨移植(取髂骨植骨)具有相似的融合率, 但是 PDGF 组具有疼痛少, 安全性能高的优点。(3)、BMPs: BMPs 是目前研究最多的可以促进骨折愈合的因子, 尤其是 BMP-2 和 BMP-7。Friedlaeder 等^[29]将 124 名患者随机分为两组, 其中一组使用锁定髓内钉与 BMP-2 联合, 另一组则使用自体骨移植来治疗胫骨不愈合, 第 9 个月发现, 两组间的骨折愈合率并没有显著差异。而另外一项研究^[30]则将 BMP-7 改成不同浓度的 BMP-2, 来治疗开放性胫骨骨折, 结果发现, 高浓度组的患者发生不良反应的几率降低了 44%, 骨折愈合率达到 58%, 而对照组的愈合率只有 38%。高浓度的 BMP-2 治疗胫骨干骨折, 不仅髓内钉的失败率和感染率低, 而且骨折愈合速度加快。已经在多个国家应用于新鲜的胫骨开放性骨折。②、全身因素: PTH: Alkhiary 团队^[31]使用 SD 大鼠闭合性股骨骨折模型研究不同剂量的 PTH 在骨折中的作用, 结果发现, 在第 21 天时, 30 μ g/kg PTH 组的大鼠股骨骨折周围骨痂体积、扭转强度、刚度、骨矿物质含量、骨密度以及软骨体积均比对照组显著增加, 但是没有导致骨吸收。同样, 一项^[32](共三组, 每组 34 人)关于绝经后妇女桡骨远端骨折的治疗中(采用闭合复位固定), 骨折后 10 天内分别使用安慰剂和 20 μ g 以及 40 μ g 的 PTH, 结果发现, 20 μ g 组效果最好, 但长期结果未报道。

还有一些炎性细胞因子在骨折愈合中的应用, 比如 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 以及 IL-4, 但是 IL-10 报道截止目前, 尚未报道。

3. 骨折延迟愈合和不愈合

尽管目前对于各种骨折的手术方案、内固定材料等技术的不断提升, 但是仍然存在部分骨折的愈合速度缓慢和不愈合。但是一些生长因子的发现, 在治疗骨折延迟愈合和不愈合的领域上取得了较大的突破性的进展。首先, 究竟什么是骨折的延迟愈合以及不愈合, 我们需要明确其概念。目前较为认可的定义为骨折延迟愈合是指在骨折完全桥接之前时, 骨外膜的反应出现了停止。而不愈合则为在骨折完全桥接之前, 无论骨外膜, 以及骨内膜反应均出现了停止。这个定义不仅明确的阐述了骨折不愈合和延迟愈合在临床上出现的时间, 也明确了出现这种症状的具体原因, 为我们临床医生的诊治, 指明了方向。

已经有很多导致骨折延迟愈合和不愈合的因素逐渐被披露, 一般可总结为

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.