

外源性 β -NGF 调节骨改建过程中的可能作用机制

茅传青, 卓丽莉, 王锦, 王承勇, 卢萌, 陈伟辉*

(福建医科大学附属协和医院口腔颌面外科, 福州市 350001)

【摘要】 目的 探讨外源性的 β -NGF 在骨缺损愈合过程中对骨改建可能作用机制。方法 利用外科手术方法切取 SD 大鼠颅骨顶部左右两侧的骨质, 建立配对大鼠颅骨标准骨缺损局部持续灌注 β -NGF 给药模型。通过免疫组织化学技术检测骨缺损区组织中 BMP-2 的表达水平以及特殊染色技术 (TRAP 染色) 检测骨缺损区组织中抗酒石酸碱性磷酸酶的表达水平, 通过图像处理软件 IPP6.0 分别测定两者积分光密度值 (IOD), 以探讨 BMP-2 与破骨细胞活性在 β -NGF 调节新骨形成和改建过程中的可能作用机制。结果 实验组 BMP-2 免疫组化染色阳性表达水平在 14 d 时 IOD 值明显高于对照组, 且差异有显著性 ($P < 0.05$); TRAP 染色结果显示: 实验组骨吸收的活性在第 7, 21, 28 天三个时间点上明显低于对照组, 且差异有显著性 ($P < 0.05$)。结论 外源性的 β -NGF 在骨缺损修复过程中具有重要的调节作用, 其可能是通过促进 BMP-2 表达和抑制破骨细胞的活性以抑制骨吸收。

【关键词】 骨形态蛋白 2; TRAP 染色; 骨改建; 破骨细胞; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0059-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.011

Possible mechanism of bone remodeling during the process of bone healing via topical application of exogenous β -NGF

MAO Chuan-qing, ZHUO Li-li, WANG Jin, WANG Cheng-yong, LU Meng, CHEN Wei-hui*

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Union Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of bone remodeling during the process of bone defect healing via topical application of exogenous β -NGF. **Methods** Thirty healthy male Sprague-Dawley rats were used in this study. Two 5-mm diameter bilateral bone defects were created on the parietal bone. The right side was given 10 μ g β -NGF/PBS solution (experimental group) and the left side was given only PBS solution (control group) via an osmotic pump for 7 days. Expression levels of BMP-2 and tartrate-resistant alkaline phosphatase (TRAP) at postoperative 3, 7, 14, 21 and 28 days were detected using immunohistochemical staining and semi-quantitatively analyzed with integral optical density (IOD). **Results** Immunohistochemistry showed that the expression levels of BMP-2 (IOD values) in the experimental group were significantly higher ($P < 0.05$) than that of the control group at postoperative day 14. Special TRAP staining results showed that the activities of osteoclasts in the experimental group was significantly decreased compared with that of the control group ($P < 0.05$) at postoperative day 7, 21 and 28. **Conclusions** The results of this study indicate that topical application of exogenous β -NGF plays an important role in bone remodeling during the process of bone defect healing, which may be through increased production of BMP-2 and inhibition of osteoclast activity.

【Key words】 Bone morphogenetic proteins-2; Trap staining; Bone defect remodeling; Osteoclasts; Rats

Corresponding author: CHEN Wei-hui, Email: dr_whchen@yahoo.com

[基金项目] 福建杰出青年基金 (编号 2012J06017); 国家自然科学基金 (编号 31070838); 福建省卫生厅青年基金 (编号 2012-1-20)。

[作者简介] 茅传青 (1988 -), 男, 硕士研究生, 专业: 口腔临床医学相关研究。E-mail: 344083604@qq.com。

[通讯作者] 陈伟辉 (1974 -), 男, 博士研究生, 副教授, 研究方向: 口腔临床相关研究。Tel: 13365910826, E-mail: dr_whchen@yahoo.com。

骨愈合、骨形成以及骨改建,是一个复杂而有序的生物过程,受到细胞因子、生长因子等多种因素的调节。众多生长因子中,骨形成蛋白家族(bone morphogenetic proteins, BMPs)在骨愈合、骨形成及骨改建过程中发挥重要的作用^[1, 2],研究证实,在众多骨形态发生蛋白中,骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2)是唯一一个能单独诱导骨形成的局部生长因子^[3],其对成骨活性具有强大的促进作用,能够募集间充质细胞,并诱导血管周围的间充质细胞转化为软骨及成骨细胞,骨细胞通过合成骨胶原,最后形成骨组织^[4-6];同时 BMP-2 还能够协调其他调节因子参与骨组织形成,从而诱导骨形成和修复骨缺损。

骨改建是由成骨细胞介导的成骨过程与破骨细胞介导的骨吸收过程共同协同调节完成。Suda 等^[7]在 1992 年就发现破骨细胞是来自造血干细胞的多核细胞,并且目前研究一致认为破骨细胞是能够进行骨吸收的唯一细胞。破骨细胞的活性在新骨形成和骨改建中起着重要的作用,破骨细胞附着在骨吸收区域形成骨陷窝,骨陷窝中的低 pH 值即可溶解无机矿物质,而破骨细胞分泌的溶酶体半胱氨酸蛋白酶和金属蛋白酶则能够降解有机基质。破骨细胞对骨折区域的骨吸收仅需 3~5 周的时间,而成骨细胞对骨折区域进行骨重建则需要 3 个月左右的时间。

我们课题组的前期实验结果已经证实:外源性的 β -神经生长因子(β -NGF)参与调节骨缺损区新骨形成及骨改建,在骨缺损修复过程中, β -NGF 对新骨形成起到促进作用(结果未发表)。为此,本课题进一步探讨外源性的 β -NGF 调节骨改建是否是通过调控 BMP-2 的合成及破骨细胞的活性而实现的。

1 材料与方法

1.1 实验动物

30 只清洁级雄性成年 SD 大鼠,体重(325 ± 25)g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供【SCXK(沪)2012-0002】。实验在福建医科大学进行【SYXK(闽)2014-0003】;在实验过程中对动物的处置依照中国科学技术部发布的指导性意见执行^[8]。

1.2 主要试剂

β -NGF(Sigma 公司,美国);I 型胶原骨粉(登腾,韩国);Evan's blue 染料(Sigma 公司,美国);Alzet Brain Infusion Kits 2 (Alzet 公司,美国);Alzet

Osmotic Pump 型号 2001 (Alzet 公司,美国);BMP-2 一抗(Abcam 公司,美国);TRAP 试剂盒(Sigma 公司,美国)PV-9001 二抗(中杉金桥,中国)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型及标本处理

大鼠颅骨骨缺损区外源性 β -NGF 导入模型的建立:采用文献^[9]方法,将 30 只 SD 大鼠随机分为 3、7、14、21 和 28 d 组,每组 6 只。所有样本采取自身对照,左侧设为对照组,右侧设为 β -NGF 实验组。按照产品使用说明书上操作说明进行 Alzet 微渗透泵与 Alzet 脑灌注试剂盒药物的装配及各个部件的组装。实验组微渗透泵内为 200 μ L 含有 10 μ g β -NGF + 196 μ L PBS + 1% Evens blue 混合液,对照组为仅含有 1% Evens blue 的 PBS 混合液。10% 水合氯醛腹腔注射麻醉 SD 大鼠,用外径为 5 mm 的环切刀在矢状缝两侧顶骨区域左右对称地制备 2 个大小为 5 mm 直径的骨缺损模型,骨缺损区填入 I 型胶原骨粉,将灌注好的微渗透泵安置于皮下,实验侧及对照侧以 1.0 μ L/h 持续导入 1 周。在设定的时间点术后 3、7、14、21 和 28 d 处死各组大鼠,4% 多聚甲醛内灌注后切取颅骨缺损区标本。中性 10% EDTA 25 $^{\circ}$ C 恒温下脱钙,组织块取材后经固定,石蜡包埋切片 4 μ m。

1.3.2 免疫组化技术检测 BMP-2 表达

石蜡切片在 79 $^{\circ}$ C 的烤箱中放置 20 min,经过二甲苯及梯度乙醇水化后,对组织抗原进行修复(50% 丙三醇水溶液 120 $^{\circ}$ C 20 min)。3% 过氧化氢室温下孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性。PBS 冲洗 3 \times 3 min,每张切片加 50 μ L 的 1:250 BMP-2 抗体,37 $^{\circ}$ C 水浴下孵育 60 min。PBS 冲洗 3 \times 2 min。甩去 PBS 液,每张切片加 50 μ L 二抗,37 $^{\circ}$ C 水浴下孵育 20 min。PBS 冲洗 3 \times 2 min。每张切片加 100 μ L 新鲜配制的 DAB 显色液,作用 1 min,显微镜下观察。流水冲洗,苏木素复染细胞核,脱水透明,中性树胶封固。

1.3.3 TRAP 染色

依照试剂说明书配制 TRAP 反应试剂及阴性对照试剂。将两组试剂加入染缸中,水浴加热至 37 $^{\circ}$ C。脱蜡水化后的玻片浸入试剂中孵育 1 h,注意避光及密封。流水冲洗,苏木精复染细胞核。晾干,中性树胶封片。

1.3.4 染色后样本图像分析

所有染色切片在相同条件下,选取靠近骨缺损区边缘两侧及中央区三个视野对骨缺损区进行图像

采集。通过统计骨缺损区域内 3 个视野的 BMP-2、TRAP 阳性表达的积分光密度(Integral optical density; IOD)平均值以评价其各自的表达水平。所得数据通过使用 Excel 2007 软件建立数据库,用 SPSS 19.0 对所得的指标进行配对 T 检验统计分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 BMP-2 染色后样本图像观察及分析

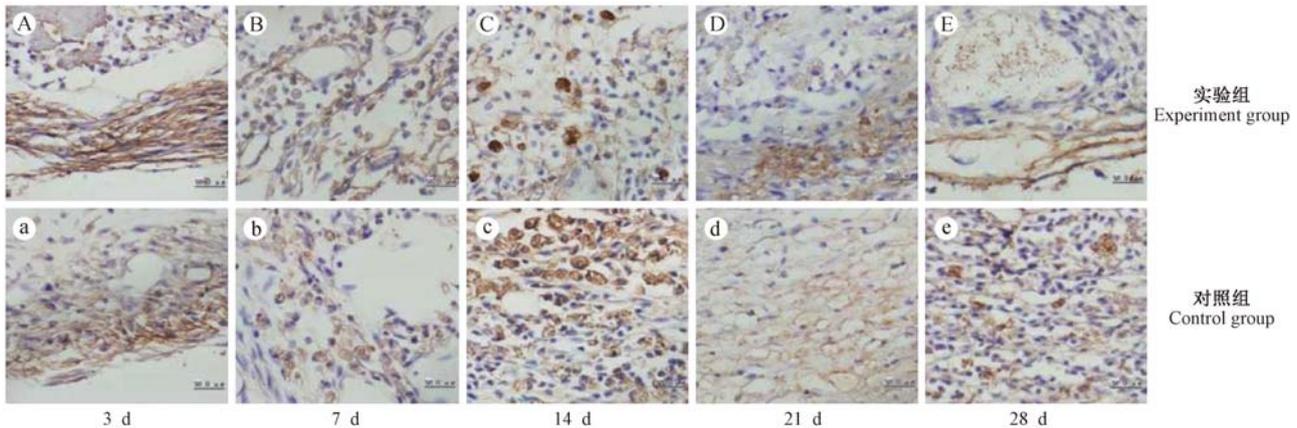


图 1 各组骨缺损区形态学观察(BMP-2 免疫组化染色 $\times 400$)

Fig. 1 The morphological changes of bone defects, BMP-2 IHC staining at different time points ($\times 400$)

2.1.2 BMP-2 表达的统计学分析

通过 IPP 6.0 图像处理软件对 BMP-2 的阳性表达积分光密度值进行统计,结果显示(如图 2):3、7 d 实验组与对照组 BMP-2 的阳性表达量无明显差别,且 3 d 至 7 d 期间 BMP-2 阳性表达无明显增长。14 d 组 BMP-2 的阳性表达积分光密度值明显升高,且实验组阳性表达量高于对照组,两者差别具有统计学意义($P < 0.05$)。21、28 d 组 BMP-2 的阳性表达逐渐降低至 3 d 水平,且两组之间无显著性差异。从整体来看,在骨缺损区早期,BMP-2 表达增加缓慢,14 d 时表达量接近峰值,21 d 时又逐渐降至初始水平。

2.2 TRAP 染色图像观察及分析

2.2.1 TRAP 染色图像观察

图 3 显示,术后 3 d 实验组与对照组基本上无 TRAP 阳性表达。7 d 组,对照组 TRAP 染色阳性强度较实验组强,且在血管周围出现强阳性染色。14 d 实验组与对照组 TRAP 染色阳性表达均较 7 d 组弱。21 d 组 TRAP 染色阳性水平与 14 d 组相比无明显减弱,且对照组 TRAP 染色阳性水平较实验组强。28 d 实验组阳性染色程度较 21 d 组有所减弱,

2.1.1 BMP-2 染色图像观察

图 1 显示:3 d 组,实验组与对照组 BMP-2 阳性表达无明显区别,阳性表达均位于硬脑膜上。7 d 组,BMP-2 阳性表达可见在血管周围的间充质细胞的细胞质中首先开始有表达,血管壁也可见阳性表达。14 d 组,BMP-2 阳性表达在成纤维细胞、间充质细胞及骨基质中有表达。21 d 组,BMP-2 阳性表达只在成纤维细胞及骨基质中有表达。28 d 组与 21 d 组表达情况基本相同。

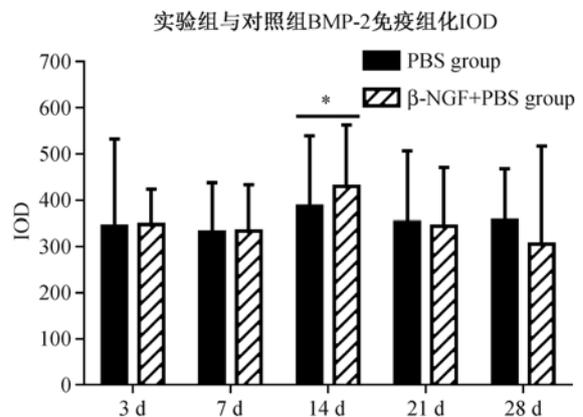


图 2 实验组与对照组 BMP-2 免疫组化积分吸光度值 ($n = 5/6$; * : $P < 0.05$)

Fig. 2 The IOD of BMP-2 immunoreactivity in experimental group and control group ($n = 5/6$; * : $P < 0.05$)

且此时对照组的 TRAP 染色阳性程度较实验组强。

2.2.2 TRAP 统计分析结果

从图 4 可以看出,术后 3 d 骨缺损区基本上无 TRAP 阳性表达,且对照组与实验组两者差别无统计学意义。术后 7 d,TRAP 阳性表达达到高峰,实验组阳性表达水平较对照组弱($P < 0.05$)。术后 14

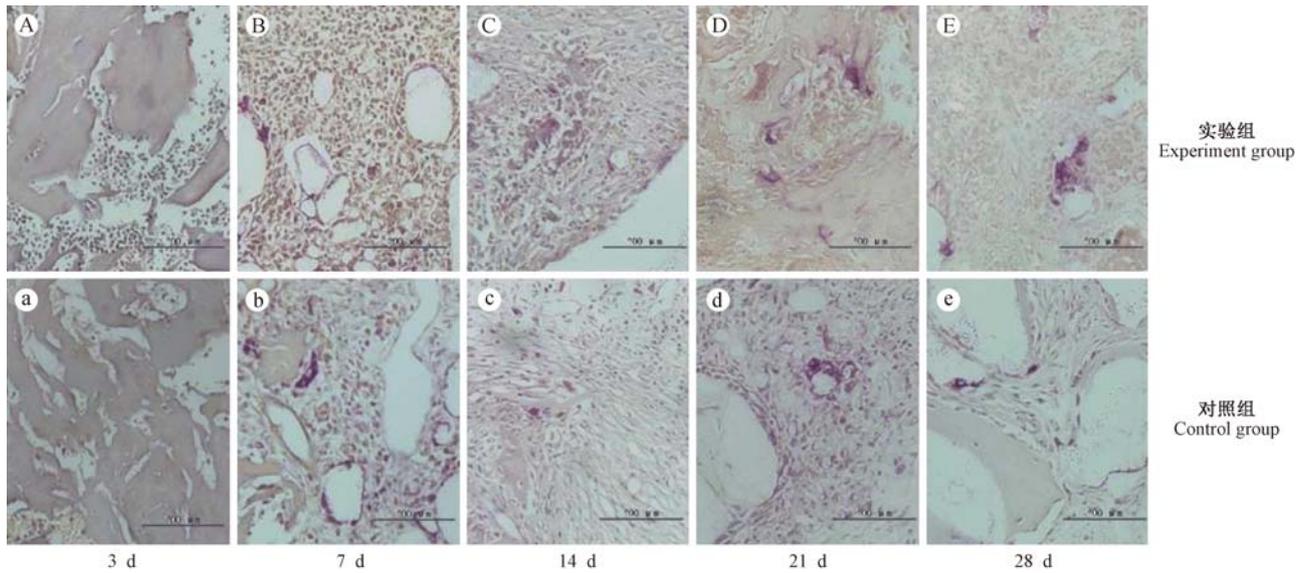


图 3 各组骨缺损区形态学观察 (TRAP 特殊染色, $\times 200$)

Fig. 3 The morphological of changes bone defects at different time points. (Trap staining, $\times 200$)

d, 实验组与对照组 TRAP 染色阳性表达开始明显减弱 ($P > 0.05$)。术后 21 d, 对照组 TRAP 染色阳性积分光密度值较术后 14 d 稍有所提升, 但实验组稍减弱, 此时实验组与对照组两者差异有显著性 ($P < 0.05$)。术后 28 d, 对照组与实验组 TRAP 染色阳性程度较 21 d 组均减弱, 但对照组强于实验组 ($P < 0.05$)。结合我们前期实验结果 (结果发表中), 在骨缺损初期, 骨吸收活动即开始, 虽然在术后 3 d 时, 我们未能观察到 TRAP 染色阳性表达; 但是术后 7 d 时骨缺损区中破骨细胞的活性达到最强, 14 d 开始减弱, 而 21、28 d 开始趋于稳定, 这一结果与我们前期实验结果相一致。

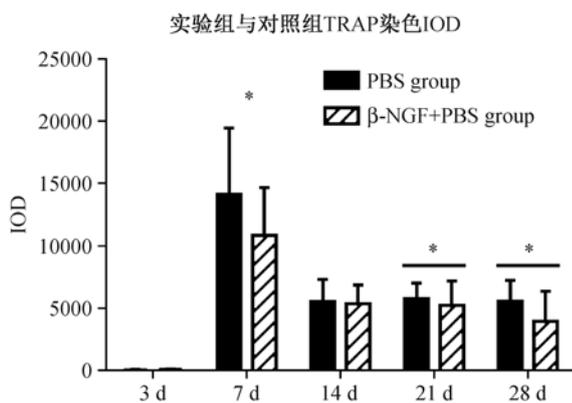


图 4 实验组与对照组 TRAP 染色积分吸光度值 ($n = 5/6$; *: $P < 0.05$)

Fig. 4 The IOD of trap staining in experimental group and control group ($n = 5/6$; *: $P < 0.05$)

3 讨论

骨改建是骨形成、骨吸收两者相互作用、相互协调的过程。我们前期已经通过利用在大鼠颅骨上建立标准骨缺损局部早期持续灌注 β -NGF 给药模型, 证实了外源性导入 β -NGF 能够促进骨愈合过程中新骨形成以及骨改建; 但 β -NGF 是通过何种作用机制对骨形成与骨吸收进行调控的尚缺乏清楚的认识。

Urist 等^[10]在 1965 年首先发现了 BMP, 他们认为 BMP 能够诱导骨生长。研究表明: BMP 通过影响软骨内成骨和膜内成骨来完成骨诱导^[11, 12]。成熟的成骨细胞内几乎所有的 BMP 都能够增强碱性磷酸酶活性。BMP-2 诱导成骨作用在近年的研究中又进一步被证实^[13, 14]。

研究证实, BMP-2 在与其他调节因子共同作用下能够更好地诱导新骨形成, β -NGF 能够协同 BMP-2 诱导形成新骨^[15]。此外, Lonn 等^[16]发现 BMP 又能够增加 NGF 的转录。而 NGF 与 BMP-2 的协同作用并不是直接的相互影响, 而是通过肿瘤坏死因子来传递的^[17]。众多研究证实, β -NGF 与 BMP-2 都能够促进新骨的形成^[18, 19], β -NGF 又能够与 BMP-2 协同促进骨的形成。 β -NGF 是否能够通过促进 BMP-2 从而促进成骨活性, 是本文的探讨重点。

本课题通过建立大鼠颅骨标准骨缺损局部早期持续灌注 β -NGF 给药模型, 在术后 3、7 d, BMP-2 稳

定在同一个水平,且 $P > 0.05$;骨缺损修复过程可分为炎症反应期,软骨痂期,硬骨痂期和骨改建期,结合前期实验的 HE 结果,我们认为此时,骨缺损尚处于炎症反应期,主要表现为炎性肉芽组织,故 BMP-2 表达较少;并且这一结果与我们前期实验测量新骨体积分数时,发现实验组与对照组在 3 d 组与 7 d 组两者新骨形成并无明显差异的结果相一致。到 14 d 组,BMP-2 出现峰值,实验组合成 BMP-2 量比对照组多,且 $P < 0.05$,而 21、28 d 组,BMP-2 的量开始减少,实验组与对照组无统计学意义。这与其他学者研究发现的在骨折发生后第二周 BMP-2 的表达达到峰值,第三周降至正常水平的结果相一致^[20]。从 14d 的结果可知, β -NGF 对 BMP-2 的表达具有促进作用。且结合我们前期的实验结果来看,实验组的成骨量明显比对照组多。也就证实了, β -NGF 能够协同 BMP-2 增强其对新骨形成的调节。

众所周知,新骨的形成与改建受到破骨细胞活性的调节作用。破骨细胞的数目相较成骨细胞数量是非常少,平均 2~3 个/ mm^3 。即便如此,如果破骨细胞的分化发生障碍或是其数量出现减少,将会导致骨质疏松等疾病;而如果其数量增加或是功能亢进,则会引起骨质疏松。这也就表明了破骨细胞在新骨形成与骨改建平衡方面起到了重要的作用。1984 年有实验模拟了体外的骨吸收模型,虽然它存在了一定的局限性,但是为我们研究骨吸收的细胞机制提供了一个良好的模型^[21, 22]。骨吸收周期如下:首先破骨细胞迁徙至所需要吸收的位点,附着在骨表面;破骨细胞产生极化,并形成骨吸收陷窝;破骨细胞溶解无机矿物质,降解有机基质;清除骨吸收陷窝内的降解物质;最后破骨细胞凋亡或是回归到非吸收的阶段。骨改建的过程被认为是一个缓慢的过程,而破骨细胞却能够快速激活,并调动钙离子和造血干细胞往往仅需几分钟到几小时^[23, 24]。因此,要促进新骨形成与骨改建,就必须能够抑制破骨细胞的活性,使骨改建的平衡向成骨方向倾斜。骨折愈合的研究发现: β -NGF 作为骨吸收的抑制剂, β -NGF 能抑制破骨细胞的活性,减少骨断端的羟脯氨酸和钙的排泄,从而减少骨组织成分的丢失,并且能够增加新骨形成,加速骨折的愈合^[25],其作用机制很可能是骨折发生后骨折部位发生强烈的炎症反应, β -NGF 通过调节骨折愈合过程中的炎性细胞和炎性介质,减轻炎症反应,从而促进骨折愈合^[26]。

TRAP 为破骨细胞和骨吸收的良好标志物。最

近的研究表明,TRAP 能够参与 OPN 的去磷酸化,调控破骨细胞表面的 $\alpha v \beta 3$ 与 OPN 相结合,从而影响破骨细胞的迁徙、粘附^[27]。因此,本实验通过 TRAP 特殊染色来标记破骨细胞,并观察其活性变化。本实验结果表明,术后 7 d 实验组与对照组的破骨细胞活性均达到最高,这与前人的研究结果一致^[28]。实验组由于外源性 β -NGF 的导入,具有活性的破骨细胞的数量明显较空白对照组的少,说明骨缺损区在骨改建早期过程中 β -NGF 能够抑制破骨细胞的数量增加;再者,其也可能是 β -NGF 通过调节骨折愈合过程中的炎性细胞和炎性介质,减轻炎症反应,从而促进骨折愈合^[26]。14 d 起,骨缺损区的破骨细胞数量明显开始下降,BMP-2 的阳性表达结果达到最强,说明骨缺损修复开始向成骨方向倾斜,破骨细胞开始凋亡。21 d 与 28 d,实验组的破骨细胞数量均较对照组少,结合前期实验结果实验组新骨形成的量高于对照组,我们认为一方面 β -NGF 有可能会通过与相关生长因子作用抑制了炎症反应进而直接促进了破骨细胞的凋亡;再者, β -NGF 通过促进新骨形成导致实验组骨缺损区域中新骨形成的面积高于对照组^[29],进而间接导致对照组的 TRAP 阳性表达高于对照组。综上所述; β -NGF 不仅能够早期的抑制破骨细胞的生长,在骨吸收周期末还能够促进破骨细胞的凋亡。

在建立大鼠颅骨标准骨缺损局部早期持续灌注 β -NGF 给药模型的基础上,通过检测骨愈合不同时期 BMP-2 的表达以及破骨细胞的活性,结果表明 β -NGF 能够通过促进 BMP-2 的合成对新骨形成进行调节,同时 β -NGF 能够抑制破骨细胞的活性从而抑制骨吸收。 β -NGF 分别通过对成骨活性的调节及对骨吸收的抑制两方面来调节骨改建。

参 考 文 献

- [1] Goldring MB, Goldring SR. Skeletal tissue response to cytokines [J]. Clin Orthop Relat Res, 1990, 258: 245-278.
- [2] Tacchetti C, Quarto R, Nitsch L, et al. In vitro morphogenesis of chick embryo hypertrophic cartilage [J]. J Cell Biol, 1987, 105(2): 999-1006.
- [3] Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications [J]. J Bone Joint Surg Am, 2002, 84-A(6): 1032-1044.
- [4] Sciadini MF, Johnson KD. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model [J]. J Orthop Res, 2000, 18(2): 289-302.
- [5] Bouxsein ML, Turek TJ, Blake C A, et al. Recombinant human

- bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2001, 83(8): 1219–1230.
- [6] Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, et al. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1992, 74(5): 659–670.
- [7] Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation [J]. *Endocr Rev*, 1992, 13(1): 66–80.
- [8] 中华人民共和国科技部. 关于善待实验动物的指导性意见 [S]. online, 2006. 09. 30. http://www.most.gov.cn/fggw/zf-wj/zfwj2006/200609/t20060930_54389.htm
- [9] 陈伟辉, 卓丽莉, 茅传青. 大鼠颅骨缺损局部持续灌注 β -NGF 给药模型的建立 [J]. *福建医科大学学报*, 2014, 9(2): 19–21.
- [10] Urist MR. Bone: formation by autoinduction [J]. *Science* 1965. 150(3698): 893–899.
- [11] Desimone DP, Reddi AH. Influence of vitamin A on matrix-induced endochondral bone formation [J]. *Calcif Tissue Int*, 1983, 35(6): 732–739.
- [12] Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes [J]. *Int Rev Cytol*, 1976, 47: 327–359.
- [13] Kim MG, Shin DM, Lee SW. The healing of critical-sized bone defect of rat zygomatic arch with particulate bone graft and bone morphogenetic protein-2 [J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2010, 63(3): 459–466.
- [14] Deconde AS, Sidell D, Lee M, et al. Bone morphogenetic protein-2-impregnated biomimetic scaffolds successfully induce bone healing in a marginal mandibular defect [J]. *Laryngoscope*, 2013, 123(5): 1149–1155.
- [15] 贝朝涌, 林卓锋, 杨志, 等. NGF 对骨折愈合影响的研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2009, 23(5): 570–576.
- [16] Lonn P, Zaia K, Israelsson C, et al. BMP enhances transcriptional responses to NGF during PC12 cell differentiation [J]. *Neurochem Res*, 2005, 30(6–7): 753–765.
- [17] Hattori A, Tsujimoto M, Hayashi K, et al. Bone morphogenetic protein-2 is markedly synergistic with tumor necrosis factor in stimulating the production of nerve growth factor in fibroblasts [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1996, 38(6): 1095–1101.
- [18] Letic-gavrilovic A, Piattelli A, Abe K. Nerve growth factor beta (NGF beta) delivery via a collagen/hydroxyapatite (Col/HAp) composite and its effects on new bone ingrowth [J]. 2003, 14(2): 95–102.
- [19] Lee SS, Huang BJ, Kaltz SR, et al. Bone regeneration with low dose BMP-2 amplified by biomimetic supramolecular nanofibers within collagen scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(2): 452–459.
- [20] Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing [J]. *J Orthop Res*, 1995, 13(3): 357–367.
- [21] Boyde A, Ali NN, Jones SJ. Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro [J]. *Br Dent J*, 1984, 156(6): 216–220.
- [22] Chambers TJ, Revell PA, Fuller K, et al. Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts [J]. *J Cell Sci*, 1984, 66: 383–399.
- [23] Kollet O, Dar A, Shivtiel S, et al. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells [J]. *Nat Med*, 2006, 12(6): 657–664.
- [24] Miller SC. Rapid activation of the medullary bone osteoclast cell surface by parathyroid hormone [J]. *J Cell Biol*, 1978, 76(3): 615–618.
- [25] Lyritis SG, Boscaino PJ. Calcitonin effects on cartilage and fracture healing [J]. 2001, 2(2): 137–142.
- [26] Sun W, Sun C, Lin H, et al. The effect of collagen-binding NGF-beta on the promotion of sciatic nerve regeneration in a rat sciatic nerve crush injury model [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(27): 4649–4656.
- [27] EK-rylander B, Flores M, Wendle M, et al. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(21): 14853–14856.
- [28] Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, et al. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2003, 14(3): 251–262.
- [29] 莫勇军, 杨志, 赵劲民, 等. NGF 促进骨折愈合的适宜浓度初步研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2011, 25(5): 575–581.

[收稿日期] 2015-09-19