

P75NTR在兔骨折不愈合局部组织中的表达及意义

李家勇¹ 王铭¹ 彭称飞¹ 蒋林彬² 张顺³ 贝朝涌^{1*}

1. 桂林医学院附属医院四肢创伤骨科, 广西 桂林 541001

2. 桂林医学院生物技术学院, 广西 桂林 541001

3. 桂林医学院附属医院, 广西 桂林 541001

中图分类号: R683.41 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 04-0437-04

摘要: 目的 探讨 P75 神经营养因子受体(P75 neurotrophin receptor, P75NTR)在兔骨折不愈合局部组织中的表达及意义。方法 30 只新西兰大白兔随机分成 A、B、C 三组, 每组 10 只。A 组建立骨折不愈合模型, B 组建立骨折模型, C 组不予处理为正常组。骨折不愈合造模成功、骨折模型愈合后, 利用免疫组织化学、Western blotting 及 IPP6.0 病理图像分析软件对三组组织中 P75NTR 的表达进行半定量分析, 测定其平均吸光度值及 P75NTR 与 β -action 的比值。结果 P75NTR 平均吸光度值骨折不愈合组为 0.3287 ± 0.0419 , 骨折组为 0.0267 ± 0.0187 , 正常组为 0.0159 ± 0.0136 。骨折不愈合组与其他两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 骨折组与正常组比较差异无统计学意义($P > 0.05$); P75NTR/ β -action 骨折不愈合组为 3.6434 ± 0.0596 , 正常组为 0.1390 ± 0.0294 , 骨折组为 0.1489 ± 0.0317 。骨折不愈合组与其他两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 骨折组与正常组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。骨折不愈合组高表达 P75NTR, 骨折组和正常组中 P75NTR 表达较低, 骨折不愈合组与其他两组比较差异有统计学意义(两种检测均显示 $P < 0.05$); 骨折组与正常组比较 P75NTR 的表达无统计学意义(两种检测均显示 $P > 0.05$)。结论 P75NTR 在兔骨折不愈合局部组织中表达, 且明显高于骨折组和正常组, 它可能是骨折不愈合形成的一个重要因素。

关键词: 骨折不愈合; P75NTR; Western blotting; 免疫组织化学

Expression and significance of P75NTR in rabbit nonunion local tissues after fracture

LI Jiayong¹, WANG Ming¹, PENG Chengfei¹, JIANG Linbin², ZHANG shun³, BEI Chaoyong^{1*}

1. Department of Limb Trauma, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541000, China

2. College of Biotechnology, Guilin Medical College, Guilin 541000, China

3. Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541000, China

Corresponding author: BEI Chaoyong, Email: beichy2008@126.com

Abstract: **Objective** To investigate the expression and significance of P75NTR (P75 neurotrophin receptor) in rabbit nonunion local tissues after fracture. **Methods** 30 New Zealand rabbits were randomly divided into A, B, and C three groups, with 10 in each group. Group A was the model of nonunion, group B was the model of fracture, and group C was untreated normal group. After nonunion models were established successfully and the fracture models were healed, the expression of P75NTR in the three groups were detected by immunohistochemistry, western blotting and Image-Pro Plus 6.0 pathological image analysis software, then the average absorbance value and the ratio of P75NTR to β -action were measured. **Results** The P75NTR average optical density of the nonunion group, the fracture group and the untreated group were 0.3287 ± 0.0419 , 0.0267 ± 0.0187 and 0.0159 ± 0.0136 , respectively. There were significant differences between the nonunion group and the other two groups ($P < 0.05$), while there was no significant difference between the fracture group and the untreated group ($P > 0.05$). The ratio of P75NTR to β -action of the nonunion group, the fracture group and the untreated group were 3.6434 ± 0.0596 , 0.1390 ± 0.0294 and 0.1489 ± 0.0317 , respectively. There were significant differences between the nonunion group and the other two groups ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the fracture group and the untreated group ($P > 0.05$). The expression of P75NTR in the nonunion group was significantly higher than that in the other two groups (both $P < 0.05$), whereas there was no significant difference

基金项目: 国家自然科学基金(81660366, 81160223); 广西自然科学基金(2015GXNSFAA139117)

* 通讯作者: 贝朝涌, Email: beichy2008@126.com

between the fracture group and the untreated group (both $P > 0.05$). **Conclusion** P75NTR expressed in rabbit nonunion local tissues and its expression was significantly higher than that in the fracture group and the untreated group. P75NTR may be an important factor in nonunion after fracture.

Key words: Nonunion; P75NTR; Western blotting; Limmunohistochemistry

骨折超过预期时间没有愈合,称为骨折不愈合,其诊断标准是:骨折后至少 9 个月仍未愈合,或者连续动态观察 3 个月,未见到骨折有明显的愈合征象^[1]。骨折不愈合的治疗一直是骨科领域的热点和难点。

P75NTR 是第一个被发现的神经营养因子受体,它能和所有的神经营养因子及神经营养因子前体蛋白结合,调控广泛的细胞功能,包括:细胞生长、分化、增殖、凋亡、神经和突触重构。研究表明:P75NTR 能促进纤维蛋白的沉积^[2]、抑制血管的生成^[3],而纤维蛋白的沉积和血管生成的减少在骨折不愈合的形成中发挥重要作用^[4-8]。

本研究拟对兔骨折不愈合骨组织、骨折愈合后骨组织及正常骨组织中 P75NTR 的表达进行测定,通过了解其在上述三组中的表达,为骨折不愈合的形成机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂:鼠抗兔 P75NTR 单克隆抗体 ab157295(abcam 公司);通用型二抗来自桂林医学院附属医院病理科。

1.1.2 实验动物:纯种新西兰大白兔 30 只(5~6 月龄),体重 2.5 ± 0.5 kg,雌雄不限,由桂林医学院动物实验部提供,实验过程中对动物处置符合善待动物意见要求。将动物随机分为 A、B、C 三组,A 组骨折不愈合造模组,B 组骨折造模组,C 组不予处理为正常组。

1.1.3 兔骨折模型及骨折不愈合模型的建立:新西兰大白兔用 25g/L 硫贲妥钠按 30 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉。麻醉后,取俯卧位,常规消毒铺巾,在前臂桡侧沿桡骨作 2.5 cm 长切口,显露桡骨,在距桡骨远端 2 cm 处截骨(兔骨折模型仅在此处截骨),再向近端距第一截骨线 1.5 cm 处做第 2 个截骨线,去除截除的 1.5 cm 骨段(包括骨膜),彻底止血,依次缝合各层,肌注青霉素 8 万单位,连注 3 d,小夹板外固定,放入笼内喂养。

1.2 方法

1.2.1 脱钙染色:三个月后,同时处死上述三组兔

子,收集的骨折不愈合组局部组织、骨折组及正常组局部骨组织编号放置于新鲜配制的 15% EDTA 脱钙液中脱钙,脱钙后清水冲洗去除标本上残留的 EDTA。所有组织均浸泡于 95% 乙醇中脱水 2 h,再置于二甲苯中 40 min。将脱钙脱水的组织石蜡包埋。

1.2.2 免疫组织化学染色:石蜡包埋组织块切片烤干后经二甲苯脱水,0.5% H_2O_2 室温孵育 10 min 灭活内源性过氧化物酶,EDTA 抗原修复,与 1:30 稀释的 P75NTR 抗体反应,4℃ 过夜。PBS 洗涤 3 次,加入通用型二抗,室温孵育 1 h,DAB 显色,经苏木精复染后进行常规脱水、封片、显微镜观察。用 IPP 6.0 病理图像分析软件定量分析三组中 P75NTR 的表达情况。

1.2.3 Western blotting 检测 P75NTR 的表达:将组织研磨离心后取上清,以 SDS-PAGE 凝胶行蛋白电泳,电泳完毕将蛋白转至 PVDF 上。转膜后在含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中封闭 1 h,TBST 洗涤 3 次,与 1:2000 稀释的 P75NTR 抗体及 β -actin 抗体反应,4℃ 过夜。洗膜 3 次,加 1:4000 稀释的二抗,室温孵育 1 h,ECL 化学发光法显色。

1.2.4 结果判定:显微镜下肉眼观察三组切片 P75NTR 表达情况,并进行比较。组织中出现棕黄色颗粒染色的为阳性,每组织切片随机选取 5 个高倍视野($\times 400$),高分辨率相机拍照后将图像输入计算机储存,使用 Image-Pro-Plus IPP6.0 医学病理图像分析系统进行半定量分析,计算每个视野的累积光密度值和累积阳性面积值,两者比值为该视野平均吸光度值,将每组 5 个视野的平均吸光度值算出后取其均数作为统计数据进行分析。

1.3 统计学处理

计量数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 20.0 统计软件行数据分析。三组之间 P75NTR 表达量的比较采用单因素的方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 光镜下三组组织形态差异

光镜下显示骨折不愈合区域存在大量纤维瘢痕

组织,断端周围区主要是纤维性骨痂。免疫组织化学染色显示三组骨组织组 P75NTR 的表达情况,见图 1。

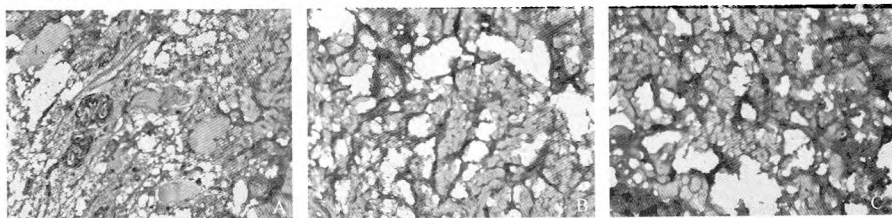


图 1 兔骨折不愈合组、骨折组及正常组局部组织 P75NTR 免疫组织化学染色 200 ×
图中可见 P75NTR 主要分布在纤维组织、纤维骨痂。A:骨折不愈合组;B:骨折组;C:正常组
Fig. 1 Immunohistochemistry of P75NTR in local tissues of rabbits in the nonunion, fracture and untreated groups 200 ×
P75NTR mainly distributed in fibrous tissue and fibrous callus. A: Nonunion group; B: Fracture group; C: Untreated group

2.2 三组标本 P75NTR 表达的差异

骨折不愈合组 P75NTR 平均吸光度值为 0.3287 ± 0.0419,骨折组 P75NTR 平均吸光度值为 0.0267 ± 0.0187,正常组 P75NTR 平均吸光度值为 0.0159 ± 0.0136。使用 SPSS 软件进行统计学分析,方差分析表明骨折不愈合组 P75NTR 平均吸光度值明显高于骨折组及正常组,差别有统计学意义 ($F = 394.875, P < 0.05$)。骨折组与正常组差别无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。

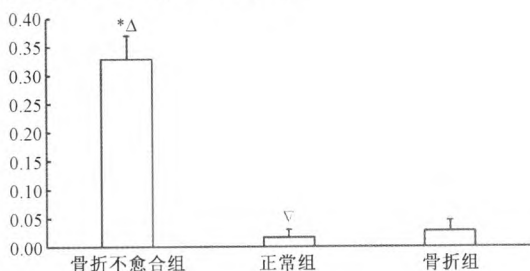


图 2 三组标本中 P75NTR 平均吸光度值
注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与骨折组比较,Δ $P < 0.05$;与骨折组比较,∇ $P > 0.05$
Fig. 2 Average absorbance value of P75NTR in the three groups
Note: Compared with the untreated group,* $P < 0.05$; Compared with the fracture group,Δ $P < 0.05$; Compared with the fracture group,∇ $P > 0.05$

2.3 Western blotting 检测三组中 P75NTR 蛋白水平

Western blotting 检测显示,骨折不愈合组 P75NTR 表达水平显著高于骨折组和正常组 ($P < 0.05$),骨折组和正常组无明显差别 ($P > 0.05$),见图 3、表 1。



图 3 Western blotting 检测三组中 P75NTR 表达
注:1 骨折不愈合组;2 正常组;3 骨折组
Fig. 3 Expression of P75NTR in the three groups detected by Western blotting
Note: 1 Nonunion group; 2 Untreated group; 3 Fracture group

表 1 三组标本 P75NTR/β-action 的比较
Table 1 Comparison of the ratio of P75NTR to β-action among the three groups

组别	P75NTR/β-action
骨折不愈合组	3.6434 ± 0.0596 ^{ab}
正常组	0.1390 ± 0.0294 ^c
骨折组	0.1489 ± 0.0317

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与骨折组比较,^b $P < 0.05$;与骨折组比较,^c $P > 0.05$
Note: Compared with the untreated group,* $P < 0.05$; Compared with the fracture group,^b $P < 0.05$; Compared with the fracture group,^c $P > 0.05$

3 讨论

正常情况下,骨折后骨折周围纤维蛋白的表达迅速升高,能促进止血,促进炎症因子趋化,并在骨折修复的起始阶段起支撑作用,随着骨折的愈合进程,其表达水平逐渐下降,至骨折完全愈合时表达水平接近零^[9]。在骨折愈合过程中,一些学者观察到持续的纤维蛋白沉积影响骨折愈合: Cole HA 等^[6]在小鼠模型中发现骨折局部的纤维蛋白持续沉积能直接刺激破骨细胞生成,导致严重的骨质疏松,影响

骨折的愈合;Yuasa M 等^[7]通过在纤维蛋白原和纤维蛋白酶原基因沉默的小鼠股骨骨折模型中发现:持续的纤维蛋白沉积抑制软骨内血管的生成和成骨作用,影响骨折的愈合。亦有学者^[4-5]对骨折不愈合局部组织切片进行分析,发现骨折不愈合断端主要是纤维样组织,无骨组织,纤维样组织离体培养后可见其中含纤维母细胞样细胞。本实验亦表明,骨折不愈合区域存在大量纤维瘢痕组织,断端周围区主要是纤维性骨痂(图 1)。

同样,血管的生成在骨折愈合的进程中亦起到非常重要的作用;Maes C 等^[8]研究表明在骨折愈合过程中,血管的生成对成骨细胞基质矿化的调节是必不可少的;软骨内血管的形成能促进成骨细胞分化,同时成骨细胞可以通过血管到达骨折部位,而阻断骨折局部的血管能抑制骨化中心的形成。

综上所述,骨折局部纤维蛋白的持续沉积和血管生成的抑制在骨折不愈合发病中起到非常重要的作用,而 P75NTR 能抑制纤维蛋白的降解和抑制血管的再生。研究表明 P75NTR 表达的升高抑制纤维蛋白的降解:P75NTR 通过下调丝氨酸蛋白酶 (serine endopeptidase)、组织型纤溶酶原激活物 (tissue plasminogen activator, tPA) 和上调纤溶酶原激活物抑制剂-1 (plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1) 来限制纤维蛋白降解^[10];同时 P75NTR 表达的升高还能抑制四肢血管^[11]、肺血管^[12-13]和视网膜色素上皮细胞血管^[14]的再生。

虽然以上学者的研究能够表明 P75NTR 影响骨折的愈合,但在骨折不愈合组织中是否存在 P75NTR 的表达至今未见报道。本实验通过检测 P75NTR 在兔骨折不愈合组、骨折组及正常组三组中的表达,发现 P75NTR 在骨折不愈合组高表达,而在骨折组及正常组中表达较低,表明 P75NTR 可能参与骨折不愈合的形成,可能是骨折不愈合形成的一个重要因素,有望成为骨折不愈合治疗的一个新的靶点。关于 P75NTR 在骨折不愈合进程中的表达情况及其引起骨折不愈合形成的机制还有待于进一步研究。

【参 考 文 献】

[1] Bishop JA, Palanca AA, Bellino MJ, et al. Assessment of compromised fracture healing. *J Am Acad Orthop Surg*, 2012, 20(5): 273-282.

- [2] Amoras ES, Gomes ST, Freitas FB, et al. NGF and P75NTR gene expression is associated with the hepatic fibrosis stage due to viral and non-viral causes. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121754.
- [3] Shanab AY, Mysona BA, Matragoon S, et al. Silencing P75 (NTR) prevents proNGF-induced endothelial cell death and development of acellular capillaries in rat retina. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2015, 2: 15013.
- [4] Schwabe P, Simon P, Kronbach Z, et al. A pilot study investigating the histology and growth factor content of human non-union tissue. *Int Orthop*, 2014, 38(12): 2623-2629.
- [5] Koga T, Lee SY, Niikura T, et al. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on bone morphogenetic protein 7-induced osteogenic differentiation of human nonunion tissue-derived cells in vitro. *J Ultrasound Med*, 2013, 32(6): 915-922.
- [6] Cole HA, Ohba T, Nyman JS, et al. Fibrin accumulation secondary to loss of plasmin-mediated fibrinolysis drives inflammatory osteoporosis in mice. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(8): 2222-2233.
- [7] Yuasa M, Mignemi NA, Nyman JS, et al. Fibrinolysis is essential for fracture repair and prevention of heterotopic ossification. *J Clin Invest*, 2015, 125(8): 3117-3131.
- [8] Maes C, Kobayashi T, Selig MK, et al. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell*, 2010, 19(2): 329-344.
- [9] Echeverri LF, Herrero MA, Lopez JM, et al. Early stages of bone fracture healing: formation of a fibrin-collagen scaffold in the fracture hematoma. *Bull Math Biol*, 2015, 77(1): 156-183.
- [10] Sachs BD, Baillie GS, McCall JR, et al. P75 neurotrophin receptor regulates tissue fibrosis through inhibition of plasminogen activation via a PDE4/cAMP/PKA pathway. *J Cell Biol*, 2007, 177(6): 1119-1132.
- [11] Caporali A, Meloni M, Miller AM, et al. Soluble ST2 is regulated by P75 neurotrophin receptor and predicts mortality in diabetic patients with critical limb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(12): e149-160.
- [12] Meuchel LW, Thompson MA, Cassivi SD, et al. Neurotrophins induce nitric oxide generation in human pulmonary artery endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(4): 668-676.
- [13] Xu M, Remillard CV, Sachs BD, et al. P75 neurotrophin receptor regulates agonist-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 295(4): H1529-1538.
- [14] Tahiri H, Yang C, Duhamel F, et al. P75 neurotrophin receptor participates in the choroidal antiangiogenic and apoptotic effects of T-lymphocyte-derived microparticles. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(9): 6084-6092.

(收稿日期: 2016-11-11, 修回日期: 2016-12-07)