

· 基础研究 ·

家兔骨折愈合过程中软骨细胞凋亡的透射电镜观察

严蕊琳¹ 马时荣¹ 王桂华² 王祖武³

(1. 嘉兴学院医学院, 浙江 嘉兴 314001; 2. 嘉兴医学院附属第二医院; 3. 杭州师范学院医学院)

【摘要】目的 观察骨折愈合中软骨细胞在软骨化骨时的死亡方式及软骨细胞的其它可能结局。**方法** 采用家兔左桡骨标准骨折, 在软骨骨痂产生的不同时期、不同部位取材, 常规制作透射电镜观察标本。**结果** ①软骨细胞生长、消亡过程可分为 3 个阶段: 成软骨细胞、肥大软骨细胞、凋亡软骨细胞。软骨细胞凋亡表现为核固缩和凋亡小体形成, 但细胞器不被破坏。最后, 软骨细胞崩解, 凋亡小体散落于软骨基质中。②软骨化骨过程中只是部分软骨细胞凋亡; 另一部分软骨细胞并不出现凋亡, 直接转变为骨细胞。**结论** ①骨折愈合时发生的软骨化骨, 是机体通过激活软骨细胞死亡程序, 以细胞凋亡达到新老细胞交替, 实现化骨。②由肥大软骨细胞组成的软骨骨痂, 能直接转变为编织骨并骨化, 支持软骨细胞能直接转变为骨细胞的理论。

【关键词】 骨折愈合; 软骨细胞; 凋亡; 电子显微镜检查, 透射

Transmission electron microscopy for the chondrocyte apoptosis in rabbit's fracture healing YAN Ruilin, MA Shirong, WANG Guihua, et al. Institute Medical College of Jiaxing (Zhejiang Jiaxing, 314000, China)

【Abstract】Objective To observe the dead manner and other possible outcomes of chondrocytes in the healing process of fracture **Methods** The standardized fracture of left radial bone was created in rabbits. The cartilage callus at the fracture site were taken at the different healing time and different position, and observed under the transmission electron microscope. **Results** The results of the study indicated that there were three stages of chondrocyte changes at the healing process: chondroblasts, hypertrophic chondrocytes and apoptotic chondrocytes. The apoptosis of chondrocytes showed nucleus shrink and apoptotic bodies, but no rupture of organelles. Finally, the apoptotic chondrocytes broke down and many apoptotic bodies were in cartilage matrix. Also it was found that not all of chondrocytes appeared apoptosis in the endochondrial ossification process. The chondrocytes without apoptosis might directly transform into osteocytes. **Conclusion** ① In fracture healing process, the endochondrial ossification was mediated by chondrocyte apoptosis. ② The cartilage callus made of hypertrophic chondrocytes can directly transform into the woven bones.

【Key words】 Fractures healing; Chondrocyte; Apoptosis; Electron microscopy, transmission

骨折愈合过程中, 机体为了对不利环境因素的适应, 断端之间或四周或多或少有软骨形成。但是, 在愈合过程中, 软骨会逐渐消失, 代之以骨。软骨细胞是怎样和通过什么方式消亡的? 细胞还有什么归宿? 这些方面尚缺乏报道。本文用透射电镜观察家兔的骨折愈合, 试图进行这方面探索。

1 材料与方法

实验用健康日本大耳白家兔 22 只, 雄性 14 只, 雌性 8 只, 体重 2~3 kg, 在麻醉及无菌条件下, 手术造成左桡骨中下 1/3 处标准骨折, 缺损度为 3 mm。

术后 4、6、8、11、14、16、18、20、23、26、29 d 各取家兔 2 只, 处死后立即取封闭骨痂、桥接骨痂、连接骨痂, 修成 0.1 mm × 0.1 mm × 0.1 mm 大小组织块, 用 3% 戊二醛固定及四氧化钼后固定, 不脱钙, 用常规方法漂洗、脱水、渗透、包埋、切片、染色。用 JEM-1200EX 透射电镜观察。

为了更好地观察软骨骨痂, 另用日本大耳白兔 8 只, 用机械力造成左桡尺骨闭合性骨折, 不固定, 在骨折后 4、7、10、13、16、20、25、30 d 各处死 1 只。电镜取材及标本制备同上。

2 结果

软骨骨痂中,软骨细胞快速进行活跃的分裂和繁殖,约 20 d 时间完成了它的生命期。为了能阐明软骨细胞的转归,我们把此过程分三个细胞阶段来描述:

2.1 成软骨细胞 骨折后第 4 d,成软骨细胞刚脱胎于原始间叶细胞时,细胞更象幼稚的成纤维细胞,光镜下可见血管周细胞向成软骨细胞过渡。典型的成软骨细胞电镜下胞质丰富,粗面内质网、高尔基复合体发达,线粒体丰富,扩张的粗面内质网腔内有低电子密度的胶原蛋白,边缘细胞质有短小突起,两突起之间构成弧状向内凹陷,有的突起脱落于周围基质中(图 1)。

2.2 肥大软骨细胞 骨折后第 10 d 起,软骨骨痂中开始有肥大软骨细胞出现,除了边缘区域外,很快在软骨骨痂中占据大部分。肥大软骨细胞胞质十分丰富,外形饱满,核圆形或椭圆,胞质内有众多的粗面内质网及线粒体,细胞突起更长,脱落于基质的突起更多、更大。细胞四周基质中有大量纤细、短小、分布杂乱的、由 II 型胶原组成的胶原原纤维(图 2)。肥大软骨细胞细胞器和胞质可脱落于四周(图 3)。

2.3 凋亡软骨细胞 骨折后约第 16 d 开始,软骨细胞逐渐出现细胞和核的固缩,细胞体积变小,电子密度增大,突起更加明显,出现多数凋亡小体。此时,细胞器仍能见,但大多处在退变之中,并出现脂质包涵物及髓鞘样结构等病变(图 4)。随后,细胞的电子密度进一步增大,体积更加缩小,凋亡小体更加增多,细胞器变得模糊不清(图 5,6)。最后,细胞分崩离析,高电子密度的细胞碎片呈点状、条索状散落在基质中,并见粉末状的钙盐结晶析出(图 7)。软骨细胞凋亡可成片出现,也可单个发生。与软骨细胞凋亡的同时,毛细血管和随之分化的成骨细胞和破骨细胞就进入凋亡区,成骨细胞常沿原先没有凋亡而已经形成的编织骨边缘生长。这样,软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞共同完成进一步改造任务。与此同时,有的软骨细胞不出现凋亡,细胞完好如初,其四周基质中很快有大量绒球状、高电子密度的羟基磷灰石沉积(图 8)。

3 讨论

3.1 软骨细胞以凋亡形式实现软骨化骨 骨折时出现的软骨骨痂,必须通过软骨化骨,最后实现骨的愈合。这与青春前长期骨骨骺端软骨通过分裂、繁殖,再经软骨化骨,达到肢体增长的过程相似。在软

骨化骨过程中,最后经历软骨细胞死亡、基质降解、毛细血管及成骨细胞和破骨细胞侵入、类骨组织形成和矿化等程序^[1]。上述软骨细胞死亡的机制尚未明了^[1]。机体细胞死亡的方式有两种,即细胞坏死和细胞凋亡。据文献报道,骨关节炎病人^[2]、经氮氧化物(NO)作用的动物^[3]、老年性动物^[4]的关节软骨常有软骨细胞凋亡,但关节炎时往往同时有软骨细胞因疾病损伤而坏死^[5]。我们通过透射电镜观察软骨化骨时软骨细胞的死亡方式,发现在细胞死亡过程中先有细胞核皱缩,电子密度增加,但此时细胞器和细胞膜仍保持完好,溶酶体并不破裂,局部没有炎症反应。这些改变与细胞坏死时的形态改变截然不同。此外,软骨细胞凋亡和其它类型细胞凋亡一样,后期常裂解成多数碎块(凋亡小体),这种凋亡小体也即我们观察到的软骨细胞的突起脱落物和细胞崩解物。这些形态改变均说明,在软骨化骨时的软骨细胞死亡属细胞凋亡,而不见细胞坏死。骨折虽为病理性损伤,但愈合过程中的软骨化骨实质上是生理性的适应改变,是机体通过激活细胞死亡程序,由基因编程的调控而引起的。事实上,无论是低等动物还是高等动物,从胚胎开始每个时期组织结构及外形变化都离不开细胞凋亡,它使组织或器官的细胞有序地新老交替^[6]。骨折愈合过程出现的软骨细胞和骨细胞也是一种新老交替,因此,软骨细胞以凋亡形式实现软骨化骨也就在情理之中了。

一般认为,凋亡为单个细胞的死亡。但本实验观察到,除了单个凋亡,软骨细胞凋亡可成片成群出现。根据文献报道,凋亡细胞仅表现为单个细胞死亡这一结论已受到挑战。例如经毒染的动物常可见具有凋亡特征的细胞,且成簇成群,有时大量发生^[7]。

3.2 软骨骨痂中的软骨可直接转化为编织骨 传统的观点认为,软骨内骨形成须包括软骨退化,血管和成骨细胞、破骨细胞进入,骨基质分泌,骨样组织形成,然后转变为编织骨^[8]。但本实验观察到,部分软骨细胞在软骨化骨时并没有退化,其分泌的软骨基质和胶原纤维在大量钙盐沉积后,被包裹的软骨细胞核及细胞器超微结构仍清晰可见。这些结果表明,软骨骨痂中的软骨可直接转化为编织骨。除此以外,在呈片块状的软骨细胞凋亡区内,由于胶原蛋白等的降解,毛细血管及依附于血管周边的周细胞等便侵入该区,周细胞演变为成骨细胞。成骨细胞常紧贴在由软骨细胞构成的编织骨边缘,成行排列,

并产生骨基质,自身也被包埋其中,参与了编织骨的改造。软骨细胞分泌 II 型胶原,其强度远不如成骨细胞分泌的 I 型胶原,现在编织骨中有了成骨细胞参与,钙化后骨的强度大大提高,弥补了原来的不足。

3.3 基质小泡和凋亡小体均可作为原始钙灶 软骨细胞从初期的成软骨细胞到肥大软骨细胞直至凋亡软骨细胞,在发育、增殖过程中均有胞质突起脱落物或细胞崩解物。在成软骨细胞和肥大软骨细胞阶段,这种脱落物称基质小泡,它是一种有膜结构的颗粒状、球状物,由于富含钙、磷离子和多种促进羟基磷灰石结晶形成的酶,因此认为基质小泡与钙化有关^[9]。软骨细胞的这种胞质脱落物,相似于机体某些外分泌腺的顶浆分泌,它通过细胞部分细胞质的脱落,再把分泌物排出,促进基质钙化。在凋亡软骨细胞阶段,细胞凋亡有大量崩解物散落出来,这种颗粒状物,称为凋亡小体。Hashimoto 等^[10]动物实验证明,在 NO 作用下关节软骨细胞形成凋亡小体,后者同样含有碱性磷酸酶、焦磷酸酶,促使关节软骨病理性钙化,这在骨关节炎和老年性骨关节病中也能见到;Roach^[11]也指出,鸡在胚胎期软骨细胞分化过程的各个阶段均能见到软骨细胞凋亡;本实验也发现,基质小泡和凋亡小体均可作为原始钙灶,率先有钙盐沉积,然后向基质扩大,互相融合。在凋亡细胞最后崩解时,凋亡小体大量散落于基质,同时粉末状钙盐结晶迅速析出。由此看来,软骨细胞的凋亡小体和基质小泡在起源上、结

构上、功能上都有相似性。但是它们也有所区别,似不能等同。凋亡小体必发生在细胞凋亡阶段;而凋亡前细胞的脱落物(非凋亡细胞的崩解物)才能称基质小泡。

(本文图 1~8 见后插页 1)

参考文献

- 1 王德文. 现代创伤修复学. 北京:人民军医出版社,1999. 131-132, 375-414.
- 2 Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, et al. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 1998, 41:1632-1638.
- 3 Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, et al. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 1998, 41:1266-1274.
- 4 Adams CS, Horton WE. Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anat Rec*, 1998, 250:418-425.
- 5 王庆蓉, 官颖鹏, 邵卫. 软骨细胞在膝骨性关节炎中的超微结构改变. *电子显微学报*, 2000, 19(6):820-824.
- 6 来茂德. 医学分子生物学. 北京:人民卫生出版社, 1999. 68-77.
- 7 王旭平译. 毒理病理学家学会的报道:凋亡、坏死或胀亡,你的诊断是什么? *劳动医学*, 1999, 16:88.
- 8 William J. Concise text of histology. 2nd ed. Baltimore: Wilkins, 1986. 68-77.
- 9 成令忠. 组织学与胚胎学. 第 4 版. 北京:人民卫生出版社, 1995. 40-44.
- 10 Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, et al. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:3094-3099.
- 11 Roach HI. New aspects of endochondral ossification in the chick: Chondrocyte apoptosis, bone formation by former chondrocytes, and acid phosphatase activity in the endochondral bone matrix. *J Bone Miner Res*, 1997, 12:795-805.

(收稿:2002-08-16 编辑:房世源)

全国骨与关节退行性变专题研讨会征文通知

由中国医疗保健国际交流促进会主办、中国医促会骨科疾病防治专业委员会承办的“全国骨与关节退行性变专题研讨会”将于 2003 年 7 月 17~20 日在呼和浩特市举行。会议将就脊柱及四肢关节的退行性疾病、有关的基础与临床研究、药物与手术治疗、人工关节与内植物等展开讨论。特别欢迎有关临床应用与长期随访的论文参加交流。2003 年 5 月 30 日以前未曾公开发表的论文均可投稿。截稿日期:2003 年 5 月 30 日(以当地邮戳为准)。包括 500~800 字的论文摘要以及 4 000 字以内的全文各一份,并附软盘(word 文档格式)。要求按照结构式摘要书写(目的、方法、结果、结论)。投稿地址:北京市丰台区太平桥 222 号精图雅园 1 单元 1302 室,中国医促会骨科疾病防治专业委员会办公室李娜收,邮政编码 100073。信封上请注明“征文”。电话:(010)63435655,63435665。本次会议为国家级继续教育项目(编号 2003-04-07-014),并授予国家级继续教育学分 10 分。所投稿件经大会学术委员会评审入选后将以书面形式发给参加会议邀请函以及会议的具体事宜。

椎管原发性肿瘤致截瘫特点与外科治疗效果分析

(正文见 199 页)

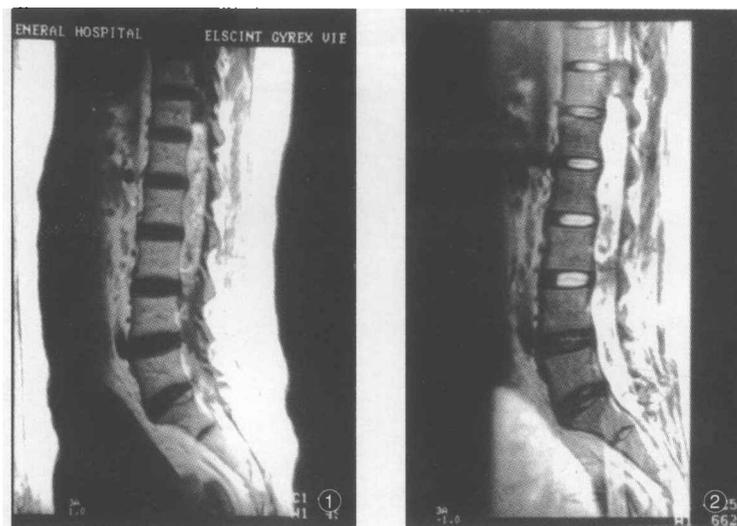


图1 T₁W 显示 T₁₁~S₁ 节段脊髓不均匀增粗呈现混杂信号, 其内囊变区为低信号, 散在出血灶呈斑点状高信号

图2 T₂W 显示不规则异常信号影, 增强后显示不均匀增强灶

家兔骨折愈合过程中软骨细胞凋亡的透射电镜观察

(正文见 217 页)

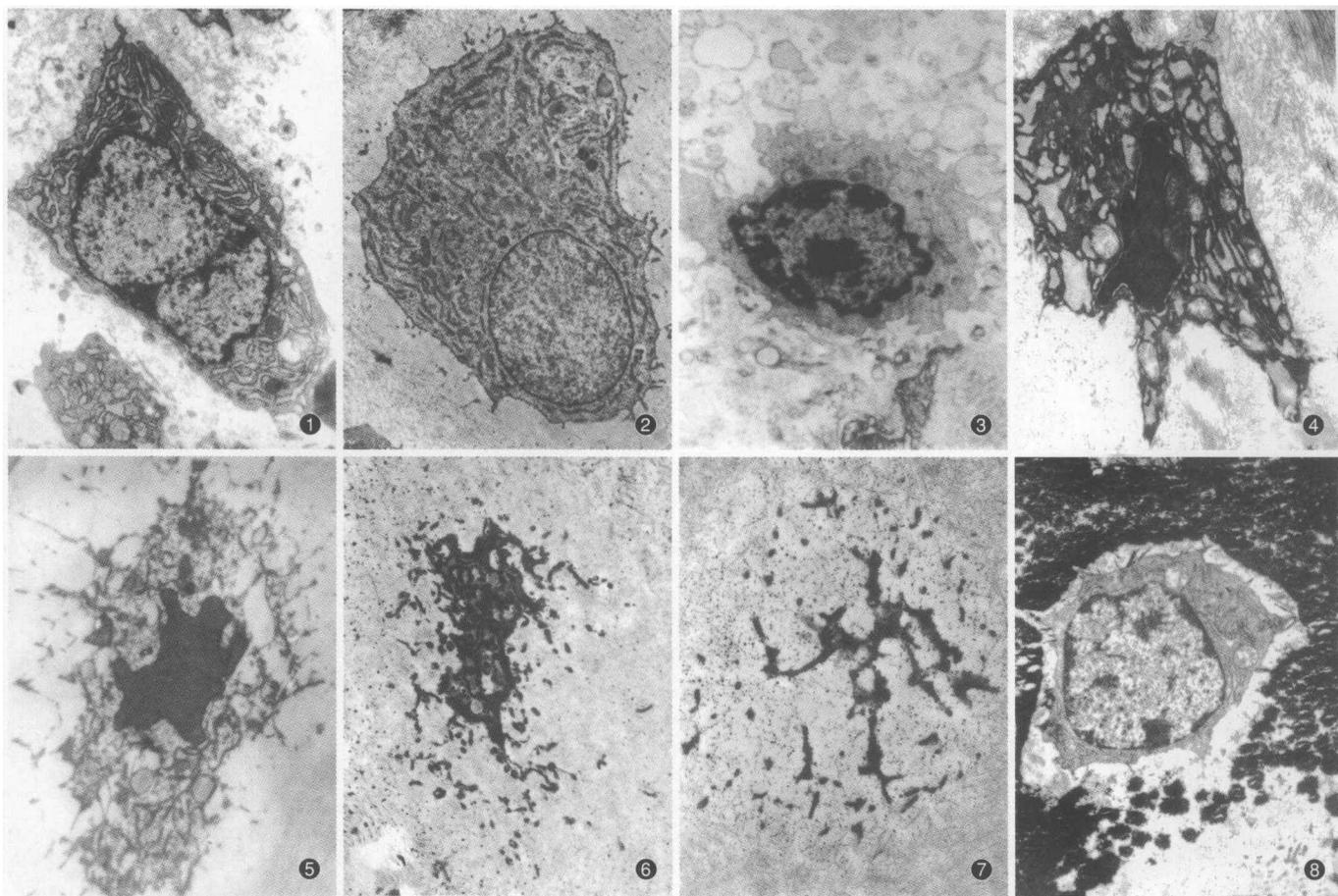


图1 正常成软骨细胞: 细胞质中线粒体、粗面内质网丰富。TEM × 8000 图2 正常肥大软骨细胞: 细胞肥大, 胞质丰富, 有多数胞浆突起。TEM × 4000 图3 肥大软骨细胞: 细胞边缘胞质和细胞器脱落于基质中形成基质小泡。TEM × 6000 图4 早期凋亡软骨细胞: 凋亡软骨细胞皱缩, 胞核固缩, 电子密度增大。TEM × 8000 图5 凋亡软骨细胞: 细胞核固缩, 细胞器模糊不清。TEM × 8000 图6 凋亡软骨细胞: 细胞固缩, 电子密度增加, 细胞器模糊不清。TEM × 7500 图7 后期凋亡软骨细胞: 细胞崩解, 大量细胞碎片(凋亡小体)散落在基质中, 并见粉末状钙盐结晶析出。TEM × 10000 图8 软骨细胞四周钙化: 正常软骨细胞四周被大量钙化, 而没有出现凋亡。TEM × 5000