

激素致股骨头骨细胞坏死、凋亡及对 bcl-2 表达影响的实验研究

李卫哲^{1*}, 李景南², 张新¹

(1. 吉林大学第一医院骨科, 吉林 长春 130021; 2. 梅河口市医院)

摘要 目的:探讨激素性股骨头坏死的发病机制。方法:选用健康成年大白鼠 30 只,体重约 200 g,随机分为实验组(冲击注射地塞米松)和对照组。实验 8 周处死动物,取股骨头作骨细胞组织病理学、超微结构观察,并用 TUNEL 及免疫组化技术分别检测骨细胞凋亡和 bcl-2 表达情况。结果:光镜下实验组较对照组股骨头骨小梁变细、稀疏、空骨陷窝明显增多,脂肪细胞增大。电镜下实验组骨细胞体积缩小,核固缩,线粒体及高尔基体肿胀,染色质边聚较多见。实验组凋亡骨细胞增多,bcl-2 表达骨细胞轻度增加。结论:激素性股骨头坏死是骨细胞凋亡和坏死共同作用的结果。

关键词 股骨头坏死; 免疫组织化学; 细胞凋亡; 骨坏死

Study of necrosis and apoptosis of osteocytes in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head LI Weizhe, LI Jingnan, ZHANG Xin. Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Jilin University (Jilin Changchun, 130021, China)

Abstract Objective: To observe necrosis, apoptosis and the expression of bcl-2 protein of osteocytes in dexamethasone (DEX)-induced osteonecrosis of the femoral head (ONFH) in rats and study the pathogenesis of the DEX-induced ONFH. **Methods:** Thirty healthy mature white rats, weighted about 200 g, were selected without sexual restriction and randomly divided into experimental group (injected with massive dose of DEX) and control group. Pathological changes, apoptosis and the expression of bcl-2 protein of the femoral heads were observed in 8 weeks. **Results:** The trabecula of femoral head of the experimental group changed to thinner and more sparse, empty bone lacune increased, the bone marrow cavity with edema and larger fatty cells were also observed and compared with the control group. Under electron microscope, experimental group showed a great deal of necrotic osteocytes with pyknotic nucleus, the cytoplasm and organell were swelling. Apoptosis and the expression of bcl-2 protein in experimental group were more than that of control group. **Conclusion:** Necrosis and apoptosis of osteocytes are coagents of the steroid-induced osteonecrosis of the femoral head.

Key words Femur head necrosis; Immunohistochemistry; Apoptosis; Osteonecrosis

骨细胞死亡分成坏死和凋亡。坏死是病理性局部组织细胞的死亡,是由非生理性致病因素造成的被动性死亡。凋亡(apoptosis)是一种自然的生理过程,是由于内外环境激发所致细胞自身主动、有序的死亡方式,其过程涉及精确的基因转录和蛋白质合成。近年的临床研究表明,这种凋亡也可发生在激素性股骨头坏死^[1]。本实验应用大白鼠激素性股骨头坏死模型,采用原位末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导 dUTP 标记法(TUNEL)和免疫组化法,观察大

剂量地塞米松对股骨头骨细胞凋亡及 bcl-2 蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 选用 30 只成年健康 Wistar 大白鼠,体重约 200 g,雌雄不限,随机分为 2 组,每组 15 只。所有的白鼠在同一条件下饲养,喂食普通颗粒饲料。实验组臀肌注射地塞米松磷酸钠 10 mg·kg⁻¹,每周 1 次,共 8 次,对照组注射等量生理盐水代替激素。2 组动物在开始用药后 8 周处死。

1.2 组织形态学检查 将全部股骨头沿冠状面劈开,用 10%福尔马林固定,将一半股骨头用 5%硝酸液脱钙后,石蜡包埋,HE 染色。光学显微镜观察股

通讯作者:李卫哲 Tel:13820828680. E-mail:Lize163-111@163.com

*现地址:天津医院创伤三科,天津 300211

骨头形态学变化及任选 3 个高倍视野取一半摄片视野测出空骨陷窝所占比例。

1.3 超微病理结构观察 将另一半股骨头软骨下切取 1 mm³ 之骨块,经 2.5% 戊二醛前固定,1% 锇酸后固定,乙醇系列脱水, Epon 812 环氧树脂包埋,醋酸铀及柠檬酸铅双染色,透射电镜观察。

1.4 凋亡细胞检测 石蜡包埋的股骨头组织切片,采用福建迈新生物技术公司的原位细胞凋亡检测试剂盒(德国 Poche Diagnostics 分装产品),按说明书操作。核快红复染,镜下观察细胞凋亡情况,核染蓝黑色为阳性,并选 3 个高倍视野,测出一半摄片视野凋亡细胞所占比例。

1.5 bcl-2 的检测 石蜡包埋的股骨头组织切片,采用武汉博士德生物技术公司的 bcl-2 免疫组化试剂盒,按说明书操作。苏木素轻度复染,镜下观察 bcl-2 表达情况,染棕黄色为阳性,并任选 3 个高倍视野测出一半摄片视野 bcl-2 表达细胞所占比例。

1.6 统计学处理 全部实验数据以均值 ± 标准差表示,不同组同一指标之间进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 组织形态学观察 股骨头颈部外形完整,软骨面平整、光滑。肉眼观察,实验组股骨头剖面呈浅红色,对照组股骨头剖面呈红色。光学显微镜检查,实验组较对照组软骨下骨板薄,骨小梁变细和稀疏,骨小梁中的细胞核变形,骨细胞少见,空骨陷窝明显增多,骨髓腔内脂肪细胞增多、增大。红骨髓受压变少。双侧股骨头软骨下区骨陷窝空虚率的平均值:实验组为 (23.51 ± 2.42)%,对照组为 (1.51 ± 0.95)%,两组比较差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。

2.2 电子显微镜观察 实验组骨细胞细胞质中可见脂滴,高尔基体、线粒体大部分肿胀,核固缩、深染,异染色质边聚。对照组骨细胞正常。

2.3 凋亡细胞及 bcl-2 的检测 实验组出现较多的凋亡骨细胞,为 (12.07 ± 2.11)%,明显多于对照组之 (1.80 ± 0.66)%, ($P < 0.01$)。实验组骨细胞 bcl-2 表达轻度升高,阳性细胞比率为 (12.86 ± 4.75)%,稍高于正常对照组之 (10.47 ± 1.59)%, ($P < 0.05$)。

3 讨论

Kawai 等^[2]和玉井健介^[3]等许多学者的研究已证明,糖皮质激素可引起股骨头骨细胞坏死。Weinstein 等^[1]对 5 例激素、3 例酒精中毒、1 例外伤、5 例

镰状细胞病所致的股骨头坏死手术切除股骨头标本用 TUNEL 技术进行凋亡细胞检测,发现激素引起的股骨头坏死切片有大量骨细胞凋亡,酒精所致股骨头坏死切片中有少量凋亡细胞,其它因素所致股骨头坏死切片中未发现凋亡细胞。因此认为激素所致股骨头坏死实际上是骨细胞凋亡。但未从实验的角度证明股骨头骨细胞存在凋亡。我们发现实验组出现较多的凋亡细胞,明显多于对照组。细胞凋亡和细胞坏死是两种截然不同的过程和生物学现象,在形态学、生化代谢改变、分子机制、结局和意义等方面都有本质的区别(表 1)。

表 1 细胞凋亡与细胞坏死的区别

Tab. 1 The differences between apoptosis and cellular necrosis

项目	细胞凋亡	细胞坏死
形态学	细胞皱缩、片段化	溶解
膜的完整性	能保持	不能保持
线粒体	不受影响	肿胀, Ca ²⁺ 内存
染色质	边聚	分解
始发因素	糖皮质激素	毒素、缺血
控制因素	激素	毒素
核生化改变	DNA 片段化	弥漫性降解

Tsujimoto 等^[4](1985)研究滤泡性非何杰金氏 B 细胞淋巴瘤时,发现在染色体转位时可以激活一种基因,即 bcl-2 基因。bcl-2 通过阻断细胞凋亡信号传递系统的最后共同通道而抑制细胞凋亡,从而促进细胞存活而成为重要的细胞生存基因。Hockenbery 等^[5]研究发现, bcl-2 蛋白能阻断内源性核酸内切酶的 DNA 切割活性,从而阻断细胞凋亡。本实验中发现实验组骨细胞 bcl-2 表达轻度升高,仅稍高于对照组,表明大剂量激素抑制了 bcl-2 的表达,促进了骨细胞的凋亡。

参考文献

- Weinstein RS, Nicholas RW. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85: 2907-2912.
- Kawai K, Tamaki A, Hirohata K. Steroid-induced accumulation of lipid in the osteocytes of the rabbit femoral head: a histological electron microscopic study. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1985, 67: 755-763.
- 玉井健介. 特发性大腿坏死症の凝固、线溶系の检讨. *Hip Joint*, 2000, 26: 120-122.
- Tsujimoto Y. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, 1985, 228: 1440.
- Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, et al. bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 6961.

(收稿日期: 2004 - 03 - 06 本文编辑: 李为农)