

发育性髋脱位髋臼软骨细胞凋亡的实验研究

韦宜山 刘万林 丁良甲 王炳海 白锐 李岱鹤 赵振群

【摘要】 目的 探讨发育性髋脱位(DDH)髋关节结构内髋臼软骨细胞凋亡与髋臼软骨发育不良的关系。**方法** 选取出生 4 周的新西兰大耳白兔 20 只,雌雄兼用,采用兔后肢屈髋伸膝位管型石膏固定制作 DDH 大耳白兔模型,右后肢管型石膏固定为实验侧,左后肢不作处理作为对照侧。固定前和固定 8 周摄骨盆正位 X 线片,根据实验侧 Shenton 线不连续及股骨头脱位于 Perkin 方格外下及外上象限判定是否造模成功。观察造模成功的 12 只大耳白兔双侧髋臼形态、软骨细胞变化、细胞凋亡以及 Bcl-2 表达情况。**结果** DDH 造模成功率 60% (12/20),实验侧髋关节 X 线片显示,髋臼上缘变钝,股骨头向 Perkin 方格外下或外上象限脱位,实验侧髋臼指数较对照侧明显增大($P < 0.05$)。实验侧髋臼变窄且有较多软组织填充,髋臼软骨色暗。软骨细胞稀疏,排列混乱。电镜下细胞染色质边集、固缩,核形不规则,细胞质内出现空泡结构。实验侧髋臼软骨细胞凋亡率高于对照侧($P < 0.05$),实验侧髋臼软骨细胞中 Bcl-2 较对照侧呈低表达($P < 0.05$)且细胞凋亡率与 Bcl-2 低表达呈正相关。**结论** DDH 髋关节结构内髋臼软骨过度细胞凋亡和凋亡因子 Bcl-2 低表达可能参与了 DDH 髋臼软骨发育不良。

【关键词】 骨疾病,发育性;髋脱位;细胞凋亡;动物,实验

The empirical study to acetabular chondrocyte apoptosis in the developmental dislocation of the hip.

WEI Yi shan, LIU Wan lin, DING Liang jia, et al. Department of Pediatric Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital, the Inner Mongolia Medical College, Huhehot 010030, China

【Abstract】 Objective To investigate the correlation of the apoptosis of acetabular chondrocyte and expression of Bcl-2 in the developmental dislocation of the hip (DDH). **Method** 20 rabbits of 4-week-old which female and male were not restricted had been made for the models. The back limb that the hip was flexed and the knee was extended then fixed with a plaster cast was made for DDH model group and the right side without fixation as the control group. Pelvis anteroposterior X-rays had been made on the models before the fixation and after 8-weeks fixation. The femoral head dislocation or not by shenton's line was discontinuity or by the femoral head was at the extabottom or extraupper quadrant of the Perkin square. 12 successful models were sacrificed at once. Observing the changes of general shape of bilateral acetabular and the changes of chondrocyte, then observing the apoptosis and expression of Bcl-2 of acetabular chondrocyte. **Results** Success rate of DDH models were 60% (12/20). Hip X-ray of experimental side shown that the superior margin of acetabulum was blunting, the femoral head was dislocation toward the extabottom or extraupper quadrant of the Perkin square, the acetabular angle of the experimental was significantly increased than the control side ($P < 0.05$). The experimental side was found that the acetabulum became narrowing and filled with soft tissue and the color of cartilage changed into dark, the chondrocytes were sparse and in a mess. Transmission electron microscopy results shown that the chromatin of acetabular chondrocytes were margination and condensation, the nuclear shape was irregular, the cytoplasmic vacuoles were present. Apoptosis rate of acetabular chondrocytes in experimental side was higher than the control side ($P < 0.05$). The expression of Bcl-2 of acetabular chondrocytes in experimental side was lower than the control side ($P < 0.05$), apoptosis and Bcl-2 expression of acetabular chondrocytes were positive correlation in experimental side. **Conclusion** Excessive apoptosis and Bcl-2 lower expression of acetabular chondrocytes may take part in the regulation of acetabular cartilage dysplasia in DDH.

【Key words】 Bone Diseases, Developmental; Hip Dislocation; Apoptosis; Animals, Laboratory

形。在力学和生物学等因素共同作用下,髌臼及股骨头软骨细胞和胞外基质分解、合成代谢失衡可能是导致 DDH 成年后髌关节骨性关节炎发病率高的的重要因素^[1]。细胞凋亡(apoptosis)是由基因控制的细胞主动死亡过程,在软骨细胞的发育、分化和形成过程中起重要作用,凋亡的过度 and 减少都能引起相关疾病^[2]。应用免疫组化和原位末端脱氧核苷酸转移酶标记(TUNEL)方法,可在单细胞水平检测到细胞凋亡^[3]。Bcl-2 是 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma/leukemia-2 gene)的缩写,被认为是最重要的凋亡因子。随着研究的进展,发现 Bcl-2 在软骨细胞凋亡中扮演关键角色,其作用突出、调控方式复杂,远未被完全揭示^[4]。

材料与方 法

一、主要材料

出生 4 周的新西兰大耳白兔 20 只,清洁级,体重(0.51 ± 0.05) kg,雌雄兼用,内蒙古农业大学实验中心提供。实验过程中对动物处置符合 2006 年国家科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[5]。主要试剂及仪器:兔抗兔 Bcl-2 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),TUNEL 检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),SP 免疫组化染色试剂盒(北京中美迈新生物医药技术有限公司),DAB 显色试剂盒(北京中美迈新生物医药技术有限公司),生物显微图像分析系统 FR-988(上海复日科技有限公司),透射电子显微镜 HITACHI H-700H 型(日本电子公司)。

二、DDH 模型的建立及取材

5% 盐酸氯胺酮按 5 ~ 10 mg/kg 肌肉注射麻醉,摄骨盆正位 X 线片(投照条件:40 kV、6.4 mAs,投照距离 40 cm),采用兔后肢屈髌伸膝位管型石膏固定制作 DDH 模型,右后肢管型石膏固定为实验侧,左后肢不作处理为对照侧。固定 8 周时摄骨盆正位 X 线片,实验侧髌臼指数增大、Shenton 线不连续及股骨头脱位于 Perkin 方格外下及外上象限判定为 DDH 造模成功^[6]。髌臼指数是指通过双侧髌臼软骨中心作直线,从髌臼软骨中心向骨性髌臼顶部外上缘最突出点作连线,所形成的夹角为髌臼指数;Shenton 线是指沿闭孔上缘划线并向外侧延伸与股骨颈内侧的连线,髌脱位时此线失去正常弧度及连续性;Perkin 方格是指通过双侧髌臼软骨中心作直线 H,从骨性髌臼顶部外上缘最突出点向 H 线作垂

线,所形成的四个象限为 Perkin 方格,股骨头位于内下象限为正常,若在外下象限为半脱位,在外上象限为全脱位。8 周后有 12 只新西兰大耳白兔 DDH 造模成功,空气栓塞法处死,迅速解剖双侧髌关节,标记并拍照。

三、髌臼软骨细胞组织学和超微结构切片染色

取实验侧和对照侧髌臼后上方 3 mm × 3 mm × 2 mm 的软骨组织 2 块,一块置于 40 g/L 甲醛固定 48 h,行脱钙、脱水、石蜡包埋、切片,HE 染色后光学显微镜下观察(×400);另一块置于 3% 戊二醛固定液固定 12 h,经漂洗、脱水、环氧树脂包埋、切片,醋酸双氧铀与柠檬酸铅双重染色后透射电镜下观察(×9 000)。

四、髌臼软骨细胞凋亡率

将 5.0 μm 厚的切片常规脱蜡水化,按照试剂说明行 TUNEL 法检测双侧髌臼软骨细胞凋亡率,凋亡的软骨细胞呈棕黄色。取实验侧和对照侧各 6 张切片,每张切片在 400 倍镜下随机观察 5 个视野,采用双盲法计数每 100 个细胞中的阳性细胞数,取平均值作为该标本的细胞凋亡率。

五、髌臼软骨细胞内 Bcl-2 表达

切片常规脱蜡水化,按照说明采用免疫组化法检测双侧髌臼软骨细胞内 Bcl-2 表达。DAB 显色,苏木精复染、常规透明、中性树胶封片,光镜下观察。以 PBS 替代一抗作为阴性对照,用已知阳性切片为阳性对照。光镜下 Bcl-2 阳性表达的细胞膜或胞浆呈浅黄至深褐色。

六、质量控制

实验设计、实施及评估均由本文第一作者直接参与并经过系统、正规培训。

七、数据分析

采用 SPSS13.0 软件进行分析和处理,数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,组内比较采用配对样本 *t* 检验,组间比较采用两独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,髌臼软骨细胞凋亡率与 Bcl-2 表达用 Pearson 相关分析进行处理。

结 果

一、髌关节结构大体标本

对照侧髌关节结构内白头结合紧密,需打开关节囊才能将白头分开,股骨头呈圆球形,髌臼呈半圆形,髌臼软骨表面光滑呈乳白色(图 1a);实验侧关节囊增厚,关节松动,股骨头向髌臼外上方脱位,股

骨头呈椭圆形,多数髌臼外上方边缘存在压迹,髌臼软骨表面失去光泽,颜色发黄(图 1b)。

二、骨盆正位 X 线片

对照侧髌关节影像结构正常,头臼轮廓清晰;实验侧髌臼缘变钝,甚至向上倾斜,Shenton 线不连续,股骨头不同程度向 Perkin 方格外上或外下象限脱位(图 2)。DDH 模型实验侧髌臼指数较对照侧明显增大($P < 0.05$,见表 1)。

三、髌臼软骨细胞组织学和超微结构改变

HE 染色光镜观察,对照侧髌臼软骨细胞形态规整,排列致密而均匀,细胞呈扁圆形,核浅着色,核仁清楚(图 3a);实验侧髌臼软骨细胞稀疏,细胞集聚成簇,排列混乱,空泡细胞和空白区增多(图 3b)。

电镜观察,对照侧髌臼软骨细胞器清晰可见,分布均衡,染色质丰富,胞质均匀,细胞核呈圆形,核仁居中(图 4a);实验侧髌臼软骨细胞体积变小,核形不规整,核密度增高、固缩,核膜表面凹凸不平,细胞浆浓缩,基质凝集成小颗粒状,线粒体轻度肿胀,细胞质内出现许多称为气穴现象的空泡结构(图 4b)。

四、髌臼软骨细胞凋亡率

TUNEL 法检测,细胞中有棕黄色颗粒即为凋亡的软骨细胞,而正常软骨细胞苏木素复染后呈蓝色。对照侧标本极少见到凋亡细胞(图 5a),实验侧凋亡的软骨细胞明显较对照侧增多(图 5b),两组比较具有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

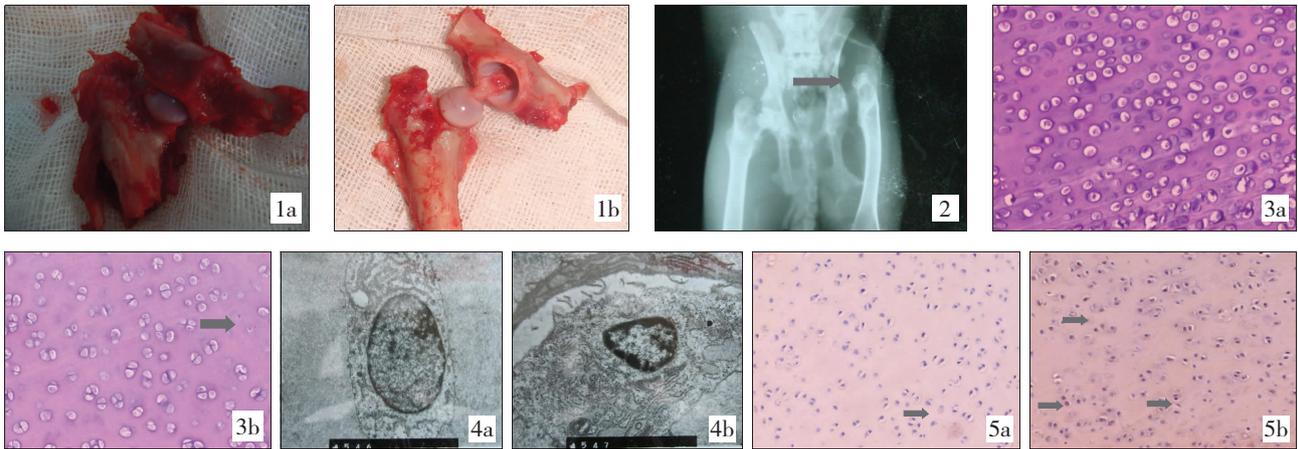


图 1a 对照侧髌关节结构内白头结合紧密,髌臼软骨表面光滑,呈乳白色。图 1b 实验侧关节囊增厚,髌臼软骨后外上方边缘存在压迹,软骨表面颜色发黄。图 2 骨盆正位 X 线片对照侧(左侧)髌关节结构正常,头臼对合良好;实验侧(右侧)髌关节完全脱位,髌臼缘向上倾斜, Shenton 线不连续,股骨头向 Perkin 方格外上象限脱位。图 3a 对照侧髌臼软骨细胞形态规整,排列致密均匀,核浅着色,核仁清楚($\times 400$)。图 3b 实验侧髌臼软骨细胞稀疏,排列混乱,可见软骨细胞肿胀,空泡细胞增多($\times 400$)。图 4a 对照侧髌臼软骨细胞细胞器清晰可见,胞核规整,染色质丰富,胞质均匀($\times 9000$)。图 4b 实验侧髌臼软骨细胞体积变小,核形不规整,核密度增高,细胞浆浓缩,内质网轻度扩张,线粒体轻度肿胀,细胞质内出现许多空泡结构($\times 9000$)。图 5a TUNEL 法检测对照侧髌臼软骨细胞中极少见到凋亡细胞($\times 400$)。图 5b TUNEL 法检测实验侧髌臼软骨细胞中凋亡细胞增多($\times 400$)。

表 1 对照侧和实验侧髌臼指数比较(度, $\bar{x} \pm s$)

侧别	n	固定前	固定 8 周时
对照侧	12	24.38 \pm 1.56	25.37 \pm 2.05
实验侧	12	24.42 \pm 1.39	37.00 \pm 1.21ab

注: a, $P < 0.05$; b, $P < 0.05$ 。

表 2 实验侧与对照侧髌臼软骨细胞凋亡率(%) 和 Bcl-2 灰度值比较(灰度值, $\bar{x} \pm s$)

侧别	n	软骨细胞凋亡率(%)	Bcl-2 灰度值
对照侧	12	0.11 \pm 0.09	52.32 \pm 7.99
实验侧	12	0.45 \pm 0.16a	58.31 \pm 10.06b

注: a, $P < 0.05$, b, $P < 0.05$ 。

五、髌臼软骨细胞内 Bcl-2 表达

Bcl-2 阳性表达的强度应用平均灰度值表示,应用病理图像分析系统进行半定量分析,灰度值与

阳性表达程度成反比,灰度值越大说明细胞内 Bcl-2 阳性表达越弱,反之则越强。对照侧髌臼软骨细胞中有 Bcl-2 阳性表达,平均灰度值为(52.32 \pm 7.99),实验侧 Bcl-2 阳性表达明显较对照侧减弱,平均灰度值为(58.31 \pm 10.06),两组差异具有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。相关性分析证实,实验侧软骨细胞凋亡率与 Bcl-2 灰度值呈正相关,相关系数为 0.939(图 6)。

讨论

早在 1992 年,Delgado 等人就利用伸膝屈髌位固定兔后肢获得了理想的 DDH 模型,并且指出人类与兔髌臼具有相似性,为利用兔制造 DDH 动物模型

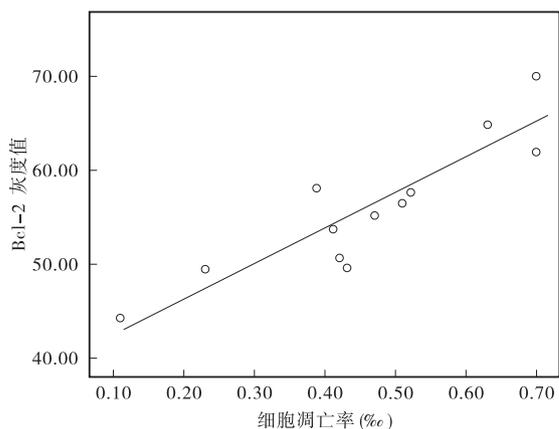


图6 实验侧 Bcl-2 灰度值与细胞凋亡相关性, 相关系数为 0.939

提供了有力依据。本实验通过影像学证实, DDH 模型确实发生了髌脱位, 实验侧髌臼指数明显大于对照侧, 且股骨头脱位于髌臼之外; 同时, 解剖髌关节大体标本发现, 脱位的实验侧髌关节囊增厚, 髌臼内软组织填充, 关节软骨色暗、无光泽, 以上表现均与人类 DDH 的髌关节病理变化类似, 证实了 Delgado 等人的观点。实验发现, DDH 模型实验侧髌臼软骨细胞排列混乱, 稀疏, 有些软骨细胞失去正常形态, 空泡细胞增多, 细胞集聚成簇, 空白区增多, 从病理学角度证实了 DDH 髌臼软骨存在发育不良, 并且某些病理变化已出现类似软骨退变的表现。结合大体标本、影像学及组织学观察结果推测: DDH 髌关节出现了髌臼软骨发育不良, 并且在髌关节应力异常等综合因素作用下, 髌臼软骨出现加速退变的征象, 这可能就是 DDH 成年后较早出现退行性骨关节炎的生物学基础。

DDH 早期出现髌臼软骨发育不良的深层次原因何在? 一般认为, DDH 的一系列髌关节病理变化是由异常机械应力、遗传、内分泌水平失衡等多因素共同作用的结果。软骨细胞是关节软骨中唯一的细胞, 它负责细胞外基质的合成和更新, 维持基质的完整^[7]。目前研究发现, 软骨细胞的异常凋亡可能是软骨退变以及骨性关节炎的重要成因, 凋亡在软骨细胞发育分化过程中可能扮演了重要的角色^[8], 由于受到严格的遗传机制程序性调控, 所以细胞凋亡又被称为程序化细胞死亡^[9]。细胞凋亡的发生机制主要与氧化应激、钙稳态失衡、线粒体损伤有关^[10,11]; 而凋亡信号转导通路主要分为死亡受体通路、线粒体信号通路和内质网信号通路^[12]。凋亡信号转导通路受许多诱导因素及调控基因的影响, 例如凋亡相关因子的失衡就是细胞凋亡的一个重要诱

因。本实验通过透视电镜观察, DDH 模型实验侧髌臼软骨细胞超微结构中, 胞质内出现了空泡结构, 胞浆浓缩, 核密度增高以及线粒体轻度肿胀等细胞凋亡表现。细胞凋亡的发生机制与线粒体损伤有关^[10]。本实验亦证实, 在 DDH 模型实验侧髌臼软骨细胞超微中出现了线粒体损伤的微观表现。Kuniyasu^[13]在关于大脑神经元细胞凋亡的研究中发现, 局部缺血的大脑神经元细胞发生凋亡之前, 细胞线粒体中细胞色素-C, 通过线粒体外膜大量释放到胞液中, 激活凋亡蛋白酶活化因子-1 (简称 Apaf-1), 活化的 Apaf-1 通过依次激活 Caspase-9 和 Caspase-3 等一系列级联反应, 最终导致细胞发生凋亡, 其间出现了线粒体肿胀及线粒体膜的稳定性降低。本实验应用 TUNEL 法检测显示, 实验侧凋亡的软骨细胞明显较对照侧增多 ($P < 0.05$)。在 DDH 模型中, 实验侧髌臼软骨细胞中存在过度细胞凋亡的直接检测证据, 超微结构中证实凋亡细胞内存在典型的细胞器变化, 推测 DDH 髌臼软骨发育不良可能是软骨细胞凋亡过度增多的结果, 换言之, 过度细胞凋亡可能造成髌臼软骨细胞无法完成正常的发育、分化, 进而影响关节软骨的塑形并使关节软骨形态发生变化。亦有学者发现, 通过细胞间的连接及通讯系统可以将机械应力、血供障碍、激素水平改变和髌关节囊内环境发生改变传递到软骨细胞, 使其线粒体膜电位下降并引发内质网胁迫, 启动了细胞凋亡的级联反应^[14]。有学者认为, 多种因素可引起关节软骨细胞凋亡, 并且软骨细胞凋亡与软骨的破坏以及关节退变之间互为因果^[15]。

研究证实, 关节软骨细胞凋亡的异常增多会引起软骨退变, 最终可能发展为骨性关节炎^[16]。影响软骨细胞凋亡的因素有许多, 越来越多的证据表明, 凋亡相关因子 Bcl-2 是抑制细胞凋亡的重要因素, Bcl-2 表达增强可以抑制细胞凋亡的发生^[17,18]。本实验通过对 Bcl-2 免疫组化的分析发现, 在 DDH 模型实验侧髌臼软骨细胞中, Bcl-2 呈相对较低的表达, 并且和软骨细胞凋亡率呈正相关, 说明 DDH 髌臼软骨细胞中 Bcl-2 低表达与软骨细胞凋亡之间存在关联, 这可能是 Bcl-2 参与 DDH 髌臼软骨发育不良调控的直接证据。Bcl-2 是目前已知的最重要的抗凋亡因子^[18], 对于 DDH 的髌关节来讲, 髌关节脱位、异常机械压力、关节内环境改变等诸多长期、慢性病理改变可能抑制了软骨细胞内 Bcl-2 的表达, 从而直接触发并诱导软骨细胞凋亡。对软骨细胞凋亡和凋亡相关因子进行适当的控制, 可能成为预防、

延缓和治疗 DDH 中髌臼软骨发育不良和加速退变的潜在途径。

本实验初步发现,DDH 髌臼软骨存在发育不良和过度细胞凋亡,过度的细胞凋亡可能在 DDH 髌臼软骨发育不良中扮演重要角色,凋亡相关因子 Bcl-2 可能在 DDH 髌臼软骨发育不良中参与了调控。

参 考 文 献

- 1 丁良甲,韦宜山.发育性髋关节脱位髌臼软骨病变的病因学研究进展[J].内蒙古医学院学报,2011,3(3):297-302.
- 2 Martins I, Galluzzi L, Kroemer G. Hormesis cell death and aging[J]. Aging, 2011,3(9):821-828.
- 3 Kalyuzhny AE. Combination of TUNEL assay with immunohistochemistry for simultaneous detection of DNA fragmentation and oxidative cell damage[J]. Methods Mol Biol,2011,682(14):15-27.
- 4 Zhang H, Li Q, Li Z, et al. The protection of Bcl-2 overexpression on rat cortical neuronal injury caused by analogous ischemia/reperfusion in vitro [J]. Neurosci Res, 2008, 6(2):140-146.
- 5 The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory[J]. Animals,2006-09-30.
- 6 张志明,马瑞雪,吉士俊,等.实验性髌臼发育不良的病理形态学研究[J].中国矫形外科杂志,2002,9(5):480-482.
- 7 Sabarinathan D, Mahalakshmi P, Vanisree AJ. Naringenin promote apoptosis in cerebrally implanted C6 glioma cells [J]. Mol Cell Biochem,2010,435(1-2):215-222.
- 8 Yudoh K, Shishido K, Murayama H, et al. Water-soluble C60 fullerene prevents degeneration of articular cartilage in osteoarthritis via down-regulation of chondrocyte catabolic activity and inhibition of cartilage degeneration during disease development[J]. Arthritis & Rheumatism, 2007,56(10):3307-3318.

- 9 Chen Y, Klionsky DJ. The regulation of autophagy unanswered questions[J]. Cell sci,2011,124(2):161-170.
- 10 Polimetta S, Gangadhara RS, Polavarapu BK, et al. Protective efficacy of natansnin, a dibenzoyl glycoside from *Salvinia natans* against CCl₄ induced oxidative stress and cellular degeneration in rat liver[J]. BMC Pharmacology, 2010,10(4):13-22.
- 11 Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer[J]. Genes Dev,2011, 25(19):1999-2010.
- 12 Amine J, Dirks-Naylor, Carrie L, et al. Glucocorticoid-induced Apoptosis and Cellular Mechanisms of Myopathy[J]. J Steroid Biochem,2009,13(117):1-7.
- 13 Kuniyasu N, Hideyuki Y, Hai C, et al. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia[J]. Biochim Biophys Acta, 2010,1802(1):92-99.
- 14 Wang XQ, Wang ZH, Zhang B, et al. The role of redox sensing in pterostilbene-induced HeLa cell apoptosis via endoplasmic reticulum pathway[J]. Chin Pharmacol Bull,2010,26(9):1184-1188.
- 15 Zamli Z, Sharif M. Chondrocyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis [J]. Int J Rhe Dis, 2011, 14(2):159-166.
- 16 Ryu JH, Shin Y, Huh YH, et al. Hypoxia-inducible factor-2 α regulates Fas-mediated chondrocyte apoptosis during osteoarthritic cartilage destruction [J]. Cell Death Differ, 2012,19(3):440-450.
- 17 Burguillos MA, Hajji N, Englund E, et al. Apoptosis-inducing factor mediates dopaminergic cell death in response to LPS-induced inflammatory stimulus: evidence in Parkinson's disease patients [J]. Neurobiol Dis,2011,41(1):177-188.
- 18 Tomasin R, Cintra Gomes-Marcondes MC. Oral administration of Aloe vera and honey reduces walker tumour growth by decreasing cell proliferation and increasing apoptosis in tumour tissue[J]. Phytother Res,2011,25(4):619-623.