

· 基础研究 ·

股骨头坏死组织中半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶 (Caspase) - 3 与细胞凋亡的关系

石磊 张兵^① 夏春*

(厦门大学附属中山医院骨科, 厦门 361004)

【摘要】 目的 探讨半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶 (Caspase) - 3 在无菌性股骨头坏死 (avascular/aseptic necrosis of femoral head, ANFH) 进展过程中的表达及意义。 **方法** 21 例 (22 髋) ANFH 取股骨头病灶周围骨松质, 其中早期 ANFH 组 (6 髋), 中期 ANFH 组 (8 髋), 晚期 ANFH 组 (8 髋); 另取 19 例 (19 髋) 新鲜股骨颈骨折的股骨头对应部位骨松质为对照组。采用原位末端标记 (TUNEL) 法、空骨陷窝计数法检测细胞凋亡水平, 比色法检测股骨头组织 Caspase-3 活性。 **结果** 骨陷窝空虚百分率 ($F = 45.43, P = 0.000$)、成骨细胞凋亡率 ($F = 120.86, P = 0.000$) 等凋亡指标均随 ANFH 临床分期进展而显著升高, ANFH 早、中期组显著高于对照组 ($q = 18.899, P < 0.05; q = 6.398, P < 0.05$), 但并不随着 ANFH 病变进展而增强, 而呈现进行性下降; ANFH 晚期组 Caspase-3 活性与对照组 Caspase-3 活性无统计学差异 ($q = 2.021, P > 0.05$)。Caspase-3 活性与细胞凋亡率统计学相关性不显著 ($r = 0.126, P = 0.425$)。 **结论** 在 ANFH 进展过程中, Caspase-3 可能不是细胞凋亡的主要执行分子; Caspase-3 在 ANFH 进展中可能发挥非凋亡作用。

【关键词】 股骨头坏死; 半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶 - 3; 细胞凋亡

中图分类号: R681.8

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2009)08-0737-05

Relationship between Caspase-3 and Apoptosis in Aseptic Necrosis of Femoral Head Shi Lei*, Zhang Bing, Xia Chun*.

* Department of Orthopaedics, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University Medical Institute, Xiamen University, Xiamen 361004, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression and role of Caspase-3 during the development of non-traumatic avascular/aseptic necrosis of femoral head (ANFH). **Methods** Tissue samples were obtained from 22 femoral heads of 21 patients with ANFH. The samples were divided into three groups: early stage (6 cases), middle stage (8 cases) and late stage (8 cases) groups according to the progress of the disease. Meanwhile, 19 tissue samples of 19 femoral heads were obtained from 19 cases of acute femoral neck fracture and set as a control group. The level of apoptosis of each group was compared in terms of the percentages of TUNEL positive osteocytes and empty osteocyte lacuna, and then the activity of Caspase-3 was detected by colorimetric method. **Results** Both the percentages of empty osteocyte lacunae ($F = 45.43, P = 0.000$) and the TUNEL positive osteocytes ($F = 120.86, P = 0.000$) increased significantly with the progress of ANFH. The two indexes in the early and middle stage groups were significantly higher than those in the control ($q = 18.899, P < 0.05$ and $q = 6.398, P < 0.05$, respectively) but decreased instead of increasing along with the progress of pathology. In the late stage group, the indexes were not significantly different from the control ($q = 2.021, P > 0.05$). Caspase-3 activity was not significantly related to the capacity of osteogenesis ($r = 0.126, P = 0.425$). **Conclusions** Caspase-3 is not the major executor of apoptosis in ANFH. It is very likely that it does not play a nonapoptotic role in the progress of the diseases.

【Key Words】 Avascular necrosis of femoral head; Caspase-3; Apoptosis

股骨头坏死 (avascular/aseptic necrosis of femoral head, ANFH) 的病理机制尚未明确, 目前仍是一种疗效差、致残率、致死率高的顽症。近年的研

究认为, 大量骨细胞、成骨细胞凋亡是 ANFH 的重要病理特征^[1-4]; 另一方面, 研究表明细胞凋亡的主要执行分子半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶 (Caspase) - 3

^① (厦门大学医学院形态学教研室, 厦门 361004)

* 通讯作者

在多个细胞系的分化过程中都发挥不可缺少支持和促进作用^[5~9]。因此, Caspase-3 活性水平并不能完全代表细胞凋亡水平, Caspase-3 是否在 ANFH 的病理机制中发挥促进凋亡的作用尚有待探讨。目前, 关于 Caspase-3 在 ANFH 组织中与细胞凋亡关系的相关文献较少, 本研究通过观察 Caspase-3 在 ANFH 病理进展过程中的表达变化, 探讨其与细胞凋亡及疾病进展的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源与分组

收集 2007 年 5 ~ 10 月收治的无菌性 ANFH 21 例(22 髌), 其中男 10 例 11 髌(包括 1 例患者双髌先后手术), 女 11 例 11 髌。年龄 31 ~ 82 岁, (49.8 ± 18.4) 岁。参考 Ficat 分期, 将 ANFH 患者分为 3 组: 早期 ANFH 组(相当于 Ficat I、II 期, 共 6 髌)、中期 ANFH 组(相当于 Ficat III 期, 共 8 髌)和晚期 ANFH 组(相当于 Ficat IV、V 期, 共 8 髌)。新鲜股骨颈骨折行股骨头置换的患者作为对照组, 共 19 例 19 髌, 其中男 11 例, 女 8 例, 年龄 50 ~ 76 岁, (60.5 ± 11.0) 岁。对照组排除已患有 AFNH 者, 排除高血压病、糖尿病、血管性疾病等可能影响 ANFH 病理进展的基础疾病。

1.2 方法

1.2.1 骨组织形态学研究 股骨头沿额状面剖开, 以股骨头坏死灶周围骨松质为研究对象, 见图 1。骨组织块(厚 < 1 cm)经多聚甲醛固定 24 h 后, 置入 10% 乙二氨四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)溶液中, 在 50 °C 恒温箱内进行 EDTA 法脱钙, 每天更换脱钙液, 14 d 天左右可达脱钙终点。脱钙后标本常规石蜡包埋, 石蜡切片机(德国 LEICA)制作额状面切片数张, 厚度 5 μm, 进一步进行常规 HE 染色, 每例标本随机计数 200 ~ 300 个骨细胞计算空骨陷窝所占百分比。

1.2.2 末端脱氧核糖核苷酸转移酶(TdT)介导的生物素酰化脱氧尿苷三磷酸(dUTP)生物素原位缺口末端标记法 [terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated biotinylated deoxyuridine-triphosphate (dUTP)-biotin nick-end labelling, TUNEL] 细胞凋亡检测 原位末端标记试剂盒由瑞士 Roche 公司提供。石蜡切片常规脱蜡至水, 按试剂盒说明操作, 二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色 2 min, 苏木素复染, 光镜下观察。TUNEL 染色阳性并伴有核染色质浓聚、核染色靠边凝集或凋亡小体形成者为

凋亡细胞, TUNEL 染色阴性为正常细胞。光镜下随机选取每张切片 5 个视野, 分别计数每 300 个细胞中凋亡细胞数, 计算凋亡细胞百分比。

1.2.3 Caspase-3 活性检测 新鲜骨组织剪碎后, 迅速进行裂解、组织蛋白提取、底物反应并检测 Caspase-3 活性以及蛋白浓度测定, 对 - 硝基酰苯胺(para-nitroaniline, pNA)比色法检测 Caspase-3 活性, 试剂盒购自碧云天生物技术研究, 具体步骤参照试剂盒说明进行。用分光光度计检测 Caspase-3 作用于特异性底物后产生的 pNA 浓度, 发射波长为 405 nm。Caspase-3 活性定义为底物饱和状态下单位质量总蛋白中能在 1 h 内作用于底物产生 1 nmol pNA 的 Caspase-3 酶量。

1.3 统计学分析

实验数据采用统计软件 SPSS13.0 进行分析。Caspase-3 活性采用多个独立样本的完全随机方差分析检验及 *q* 检验两两比较分析; 空骨陷窝百分率、细胞凋亡百分率在进行平方根反正弦正态处理后转换为正态分布数据, 再进行上述方差分析和 *q* 检验。相对定量指标以定量指标用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用线性回归法进行相关性分析。检验水平: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 骨组织形态学观察

镜下观察股骨头坏死灶组织, 对照组股骨头对应区域骨细胞形态尚正常, 胞膜无皱缩, 骨陷窝空虚偶见, 未见新生骨小梁显示新鲜骨折修复尚未开始(图 2A); 早期 ANFH 组织骨细胞形态基本正常, 成骨细胞显著增多, 新生骨小梁可见, 骨小梁因成骨修复而变粗变厚, 少量骨陷窝空虚(图 2B); 中期, 骨细胞多偏侧, 核固缩可见, 空骨陷窝增加, 成骨细胞较早期显著减少, 破骨细胞可见, 骨小梁较前已明显变薄(图 2C); 晚期, 出现大量空骨陷窝, 残存骨细胞胞核变形、固缩, 成骨细胞少骨小梁变薄、折断可见(图 2D)。

2.2 骨组织 TUNEL 法凋亡检测

凋亡细胞胞核被染成棕黄色, 核形态固缩可见。对照组仅偶见 TUNEL 阳性细胞(图 3A), 早期 ANFH 组可见 TUNEL 阳性细胞显著增加(图 3B), 中期 ANFH 组 TUNEL 阳性细胞进一步增多(图 3C), 晚期 ANFH 组可见大量 TUNEL 阳性细胞(3D)。各组别空陷窝百分比及细胞凋亡百分率的比较见表 1。

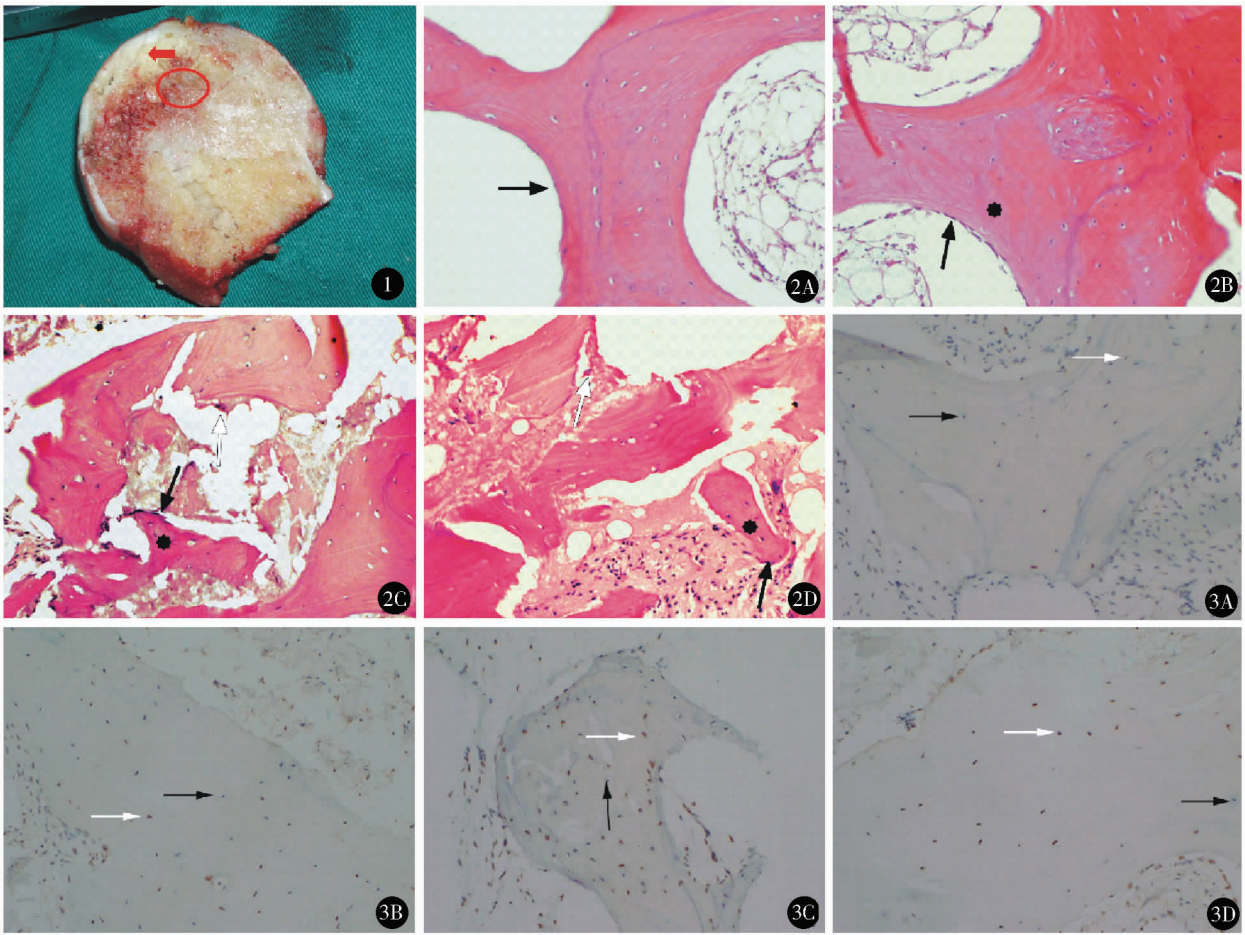


图1 股骨头坏死标本及骨质取材部位示意图 ○取材部位、范围;←软骨下坏死骨 图2 股骨头骨组织陷窝空虚情况(HE染色×100) A.骨折对照组骨陷窝仅偶见空虚;B.早期ANFH组见少量骨陷窝空虚;C.中期ANFH组骨陷窝空虚明显增加;D.晚期ANFH组大部分骨陷窝已经空虚(黑箭头——成骨细胞,白箭头——破骨细胞,八角星形——新生骨小梁) 图3 股骨头组织TUNEL检测(阳性细胞DAB染色,阴性细胞苏木素复染×100) A.对照组,仅见个别骨细胞呈TUNEL阳性;B.早期ANFH组,TUNEL阳性细胞明显增多,尚少于正常细胞;C.中期ANFH组,TUNEL阳性细胞进一步增加,所占比例大致与正常细胞相当;D.晚期ANFH组,细胞数显著减少,残存细胞基本均呈TUNEL阳性,骨小梁骨折可见(黑箭头——正常细胞;白箭头——TUNEL阳性细胞)

表1 各组空骨陷窝百分比和成骨细胞凋亡百分率的比较

组别	空骨陷窝 百分比(%)	成骨细胞凋亡 百分率(%)
对照组(n=19)①	27.65±8.10	5.91±4.29
早期ANFH组(n=6)②	38.50±7.61	33.28±17.47
中期ANFH组(n=8)③	40.55±9.81	63.24±18.25
晚期ANFH组(n=8)④	67.31±6.14	90.37±9.10
F,P值	45.43,0.000	120.86,0.000
q,P值	q ₄₋₁ =16.496, P<0.05 q ₄₋₂ =9.351, P<0.05 q ₄₋₃ =9.382, P<0.05 q ₃₋₁ =5.365, P<0.05 q ₃₋₂ =0.665, P>0.05 q ₂₋₁ =4.062, P<0.05	q ₄₋₁ =24.964, P<0.05 q ₄₋₂ =13.169, P<0.05 q ₄₋₃ =6.759, P<0.05 q ₃₋₁ =16.945, P<0.05 q ₃₋₂ =6.911, P<0.05 q ₂₋₁ =7.281, P<0.05

成骨细胞凋亡率与骨陷窝空虚率呈显著正相关($r=0.812, P=0.000$),
回归方程为: $\hat{Y}=0.3789X+0.2525$ (\hat{Y} 为骨陷窝空虚率, X 为细胞凋亡率)。

2.3 Caspase-3 活性检测

Caspase-3 活性在早期 ANFH 组最高,在中期及

晚期组渐下降但仍高于对照组, ANFH 组 Caspase-3 水平高于对照组,各组 Caspase-3 活性见表2。

表2 各组 Caspase-3 活性的比较

组别	Caspase-3 活性 (1 U=1×10 ⁻⁸ nmol·μg ⁻¹ ·h ⁻¹)
对照组(n=19)①	15.80±8.19
早期ANFH组(n=6)②	60.27±5.27
中期ANFH组(n=8)③	29.35±5.96
晚期ANFH组(n=8)④	20.08±6.25
ANFH组(2~4组合并,n=22)⑤	34.41±17.62
F,P值	62.00,0.000
q,P值	q ₁₋₂ =18.899, P<0.05 q ₃₋₁ =6.398, P<0.05 q ₄₋₁ =2.021, P>0.05 q ₂₋₄ =14.810, P<0.05 q ₃₋₄ =3.690, P<0.05
t _{1,5} ,P _{1,5} 值	-4.221,0.000

2.4 相关性分析

对 Caspase-3 活性与细胞凋亡率的相关性分析显示, Caspase-3 活性与细胞凋亡率的相关性不显著($r = 0.126, P = 0.425$)。鉴于骨折组的年龄与

ANFH 组存在显著差异[骨折组(60.5 ± 11.0)岁, ANFH 组(49.8 ± 18.4)岁, $t = 2.202, P = 0.034$], 对年龄同 Caspase-3 活性、细胞凋亡率的相关性进行分析, 无明显相关性($P > 0.05$), 见表 3。

表 3 Caspase-3 活性、细胞凋亡率、年龄相关性分析

X	\hat{Y}	线性回归方程	r 值	P 值
Caspase-3 活性	细胞凋亡率	$\hat{Y} = 0.0027 X + 0.3064$	0.126	0.425
年龄	Caspase-3 活性	$\hat{Y} = -0.0685 X + 29.543$	0.066	0.682
年龄	细胞凋亡率	$\hat{Y} = -0.0068 X + 0.7475$	0.306	0.052

3 讨论

ANFH 是以骨细胞、成骨细胞凋亡为主要病理改变的疾病。以往研究显示 ANFH 组股骨头组织细胞凋亡率显著高于对照组^[1-4], 本研究结果表明, ANFH 各组细胞凋亡率和骨陷窝空虚率随着 ANFH 临床分期的进展而显著上升, 即 ANFH 的进展是细胞凋亡水平进行性升高的过程, 进一步证实了凋亡与 ANFH 病变进展的相关性。ANFH 中 Caspase-3 与股骨头骨细胞、成骨细胞凋亡的关系尚须进一步证明。

经典理论认为, Caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, 在细胞凋亡过程中起到不可替代的作用。细胞凋亡途径主要包括外源性通路和内源性通路, 前者由位于胞膜的死亡受体介导^[10], 后者主要由线粒体释放的细胞色素 C 介导^[11]。一旦对细胞重要成分执行致命性切割的 Caspase-3 被激活, 细胞死亡将不可避免出现^[10, 11]。目前已证实, 由 Caspase-3 介导的细胞凋亡是多种疾病的关键环节^[2, 12, 13]。而 Caspase-3 在 ANFH 中的作用如何, 目前尚须进一步证据证实。体外实验及动物模型实验均已表明, Caspase-3 的激活与骨细胞、成骨细胞的凋亡密切相关。包倪荣等^[14]用不同浓度的地塞米松处理胎鼠成骨细胞, 观察到 Caspase-3 活性升高、NF- κ B (参与抑制凋亡, 维持细胞存活) 活性下降, 同时细胞存活率下降、凋亡率增加; Chua 等^[15]的研究表明, 糖皮质激素可通过内源性和外源性凋亡途径激活 Caspase-3, 最终诱导小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 凋亡。Liu 等^[16]在骨细胞 MLO-Y4 及成骨细胞中转染表达钙离子结合蛋白 Calbindin-D28k 后, 可抑制糖皮质激素诱导的 Caspase-3 活性, 从而减少细胞凋亡。ANFH 的主要病因之一糖皮质激素可通过激活 Caspase-3 活性诱导骨细胞、成骨细胞凋亡, 这可能成为 ANFH 病理机制的重要环节。那么, Caspase-3 是否与 ANFH 的骨细胞、成骨细胞凋亡相关? 相关研究国外尚未见报道, 国内暴淑英等^[17]通过醋酸泼尼松龙肌注并强迫直立位的方法

建立大鼠早期股骨头坏死模型, 模型组股骨头病灶内空骨陷窝率升高, 提示细胞凋亡增加, 同时免疫组化染色显示 Caspase-3 表达上调、凋亡抑制因子 bcl-2 表达下调, 因此, 认为 Caspase-3 与 ANFH 的凋亡病变相关。该研究尚未建立 ANFH 晚期股骨头发生塌陷的动物模型, 仅能反映 ANFH 早期病变情况, 此外采用免疫组化法对 Caspase-3 进行染色, 无法分辨 Caspase-3 无活性前体与活性片段 2 种形式, 均可能对结果的可靠性产生影响。

本项研究采用比色法检测各期 ANFH 组织的 Caspase-3 活性, 结果表明 Caspase-3 活性在 ANFH 组整体水平显著高于骨折对照组 (表 2), 提示 Caspase-3 很可能参与了 ANFH 细胞凋亡的过程。另一方面, 随着 ANFH 病变的进展, Caspase-3 活性并未随着细胞凋亡率升高而上调, 反而呈下降趋势; 相关性分析也显示 Caspase-3 活性与细胞凋亡率的统计学相关性不显著($r = 0.126, P = 0.425$)。本研究认为 Caspase-3 可能仅部分参与了 ANFH 凋亡的执行, 其与 ANFH 凋亡的相关性尚须建立各期 ANFH 的动物模型进一步证明。Caspase-3 活性与细胞凋亡水平相关性不显著的原因可能有 2 个方面: ①不依赖 Caspase-3 的细胞凋亡通路 (包括自吞噬作用^[18], 副凋亡^[19, 20], 有丝分裂危象^[21]等) 近年已陆续报道, ANFH 病变中的细胞凋亡至少部分通过不依赖 Caspase-3 的途径进行, Caspase-3 活性在 ANFH 早期升高无法证明所有细胞凋亡均由 Caspase-3 介导, 尚须进一步研究。②Caspase-3 在 ANFH 中除参与执行凋亡外, 还可能发挥促进分化等非凋亡作用, 亦可能参与成骨修复的调控。目前, 已有研究表明 Caspase-3 在体外及动物模型均可促进成骨修复, 而高度抑制 Caspase-3 活性则可使成骨分化过程受到抑制^[8, 9], 其促进成骨的作用对 ANFH 组织骨质修复的影响尚不明确, 有待进一步研究。随着 ANFH 的进展, 股骨头组织空骨陷窝数及骨细胞凋亡率均进行性增加, 亦说明 Ficat 分期能较好地反映 ANFH 的病变程度。(下转第 746 页)

参考文献

- 何宇, 杨述华, 梁袁昕. 创伤性股骨头坏死中骨细胞凋亡初探. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(16):1238-1240.
- Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(8):2907-2912.
- 熊明月, 王坤正, 党晓谦. 早期激素性股骨头坏死骨细胞凋亡的实验研究. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(3):262-265.
- 郭坤亮, 安洪, 蒋电明, 等. 早期酒精性股骨头缺血坏死骨细胞凋亡的实验研究. 重庆医科大学学报, 2003, 28(3):313-315.
- Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, et al. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. PNAS, 2002, 99(17):11025-11030.
- Okuyama R, Nguyen BC, Talora C, et al. High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism. Dev Cell, 2004, 6(4):551-562.
- Oomman S, Strahlendorf H, Dertien J, et al. Bergmann glia utilize active caspase-3 for differentiation. Brain Res, 2006, 1078(1):19-34.
- Mogi M, Togari A. Activation of caspases is required for osteoblastic differentiation. J Biol Chem, 2003, 278(48):47477-47482.
- Miura M, Chen XD, Allen MR, et al. A crucial role of Caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. J Clin Invest, 2004, 114(12):1704-1713.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death Receptors: Signaling and Modulation. Science 1998, 281(5381):1305-1308.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, et al. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. Cell, 1998, 94(4):481-490.
- 蒋杞英, 胡艳秋, 程相树, 等. 孕期酒精接触对子鼠视皮质神经元凋亡的影响. 解剖学报, 2007, 38(4):400-404.
- 金武丕, 权修权, 孟繁平, 等. 大鼠酒精性肝病细胞凋亡与细胞色素 P4502E1 和氧化应激的关系. 世界华人消化杂志, 2007, 15(20):2181-2185.
- 包倪荣, 赵建宁, 王与荣, 等. 地塞米松诱导成骨细胞凋亡. 南京医科大学学报(英文版), 2004, 18(5):256-261.
- Chua CC, Chua BH, Chen Z, et al. Dexamethasone induces caspase activation in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. Biochim Biophys Acta, 2003, 1642(1-2):79-85.
- Liu Y, Porta A, Peng X, et al. Prevention of glucocorticoid-induced apoptosis in osteocytes and osteoblasts by calbindin-D28k. 2004, 19(3):479-490.
- 景淑英, 赵庆国, 毕黎琦. 激素性股骨头坏死早期细胞凋亡相关基因表达及阿仑磷酸钠的干预. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(46):9095-9099.
- Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: A double-edged sword. Science, 2004, 306(5698):990-995.
- 张军, 胡大海. AIF 诱导细胞凋亡. 医学分子生物学杂志, 2008, 5(1):87-90.
- Sperandio S, Poksay K, de Belle I, et al. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. Cell Death Differ, 2004, 11(10):1066-1075.
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. Oncogene, 2004, 23(16):2825-2837.

(收稿日期:2008-09-12)

(修回日期:2009-01-02)

(责任编辑:李贺琼)