

· 基础研究 ·

信号传导及转录激活因子 1 诱导骨细胞凋亡 在激素性股骨头坏死过程中的作用

许心弦, 温宏, 吕杨训, 胡月正, 余华晨, 潘孝云

(温州医科大学附属第二医院, 浙江 温州 325027)

摘 要 **目的:**探讨信号传导及转录激活因子 1 诱导细胞凋亡在激素性股骨头坏死过程中的作用。**方法:**选择 30 例激素性股骨头坏死组织标本, Ficat I 期和 II 期患者 10 例(A 组)、Ficat III 期患者 10 例(B 组)、Ficat IV 期和 V 期患者 10 例(C 组), 同时选择 10 例接受股骨颈骨折内固定手术的正常股骨头组织标本(D 组)。对所有标本在光镜下观察测定空骨陷窝率, 采用 TUNEL 凋亡检测法测定细胞凋亡率, 分别采用免疫组化法和 ELISA 法对磷酸化信号传导及转录激活因子 1 的表达进行定性和定量检测, 同时分别对细胞凋亡率与空骨陷窝率和磷酸化信号传导及转录激活因子 1 表达量进行相关性分析。**结果:**4 组患者股骨头空骨陷窝率比较, 差异有统计学意义[(29.10 ± 6.14)%, (54.10 ± 7.33)%, (75.25 ± 7.80)%, (7.20 ± 1.32)%, $F = 227.614$, $P = 0.000$]; A 组空骨陷窝率高于 D 组($P = 0.000$), B 组高于 A 组($P = 0.000$), C 组高于 B 组($P = 0.000$)。4 组患者股骨头细胞凋亡率比较, 差异有统计学意义[(5.70 ± 3.27)%, (36.90 ± 9.53)%, (70.30 ± 13.63)%, (2.80 ± 2.57)%, $F = 136.004$, $P = 0.000$]。A 组和 D 组比较, 差异无统计学意义($P = 0.209$); B 组高于 A 组($P = 0.000$), C 组高于 B 组($P = 0.000$)。4 组患者股骨头磷酸化信号传导及转录激活因子 1 定性检测结果比较, 差异有统计学意义[(3.15 ± 0.82), (5.97 ± 1.01), (8.56 ± 0.94), (1.00 ± 0.56), $F = 150.005$, $P = 0.000$]。A 组高于 D 组($P = 0.000$), B 组高于 A 组($P = 0.000$), C 组高于 B 组($P = 0.000$)。4 组患者股骨头磷酸化信号传导及转录激活因子 1 定量检测结果比较, 差异有统计学意义[(1.86 ± 0.43), (5.04 ± 2.24), (11.14 ± 2.49), (1.00 ± 0.28), $F = 73.466$, $P = 0.000$]。A 组高于 D 组($P = 0.000$), B 组高于 A 组($P = 0.000$), C 组高于 B 组($P = 0.000$)。空骨陷窝率和细胞凋亡率呈正相关($r_s = 0.882$, $P = 0.000$), 细胞凋亡率和磷酸化信号传导及转录激活因子 1 表达量呈正相关($r_s = 0.860$, $P = 0.000$)。**结论:**骨细胞凋亡是激素性股骨头坏死的重要过程, 并且信号传导及转录激活因子 1 可能在其中发挥了重要作用。

关键词 股骨头坏死 糖皮质激素类 细胞凋亡 信号传导 转录激活因子类

Effect of bone cell apoptosis induced by signal transducers and activators of transcription-1 in the process of steroid-induced necrosis of femoral head Xu Xinxian*, Wen Hong, Lyu Yangxun, Hu Yuezheng, Yu Huachen, Pan Xiaoyun.

* The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, Zhejiang, China

ABSTRACT **Objective:** To explore the effect of bone cell apoptosis induced by signal transducers and activators of transcription-1 (STAT1) in the process of steroid-induced necrosis of femoral head (SNFH). **Methods:** The tissue samples of femoral head were fetched from 30 patients with SNFH. Ten patients (Group A) were categorized as Ficat phase I or II, 10 patients (Group B) as Ficat phase III, 10 patients (Group C) as Ficat phase IV or V. Meanwhile, ten normal bone tissue samples (Group D) were obtained from internal fixation surgery for femoral neck fractures. All the samples were observed under the optical microscope and the empty bone lacuna rate were measured, then the TUNEL apoptotic detection method was used to detect the apoptosis rate. After that, qualitative and quantitative detection on the expression of phosphorylated STAT1 (p-STAT1) were carried out by immunohistochemical method and ELISA method respectively. Meanwhile, correlation analysis were applied to study the relationship between empty bone lacuna rate and apoptosis rate and between empty bone lacuna rate and p-STAT1 expression. **Results:** There was statistical difference in the empty bone lacuna rate of femur head among the 4 groups (29.10 ± 6.14%, 54.10 ± 7.33%, 75.25 ± 7.80%, 7.20 ± 1.32%, $F = 227.614$, $P = 0.000$). The empty bone lacuna rate was higher in group A compared with group D ($P = 0.000$), was higher in group B compared with group A ($P = 0.000$), and was higher in group C compared with group B ($P = 0.000$). There was statistical difference in the apoptosis rate of femur head between the 4 groups (5.70 ± 3.27%, 36.90 ± 9.53%, 70.30 ± 13.63%, 2.80 ± 2.57%, $F = 136.004$, $P = 0.000$). There was no statistical difference in the apoptosis rate of femur head between group A and group D ($P = 0.209$). The apoptosis rate was higher in group B compared with group A

($P=0.000$) and was higher in group C compared with group B ($P=0.000$). There was statistical difference in the results of qualitative detection of femur head p-STAT1 between the 4 groups ($3.15 \pm 0.82, 5.97 \pm 1.01, 8.56 \pm 0.94, 1.00 \pm 0.56, F=150.005, P=0.000$). Group A surpassed group D ($P=0.000$), group B surpassed group A ($P=0.000$), and group C surpassed group B ($P=0.000$). There was statistical difference in the results of quantitative detection of femur head p-STAT1 between the 4 groups ($1.86 \pm 0.43, 5.04 \pm 2.24, 11.14 \pm 2.49, 1.00 \pm 0.28, F=73.466, P=0.000$). Group A surpassed group D ($P=0.000$), group B surpassed group A ($P=0.000$), and group C surpassed group B ($P=0.000$). The results of correlation analysis showed that the empty bone lacuna rate and the expression quantity of p-STAT1 were positively correlated with the apoptosis rate ($r_s=0.882, P=0.000; r_s=0.860, P=0.000$).

Conclusion: STAT1 may play an important role in bone cell apoptosis, which is important for the process of SNFH.

Key words Femur head necrosis; Glucocorticoids; Apoptosis; Signal transduction; Activating transcription factors

激素性股骨头坏死早期以骨质疏松和骨细胞点灶状坏死为特点,晚期往往表现为股骨头塌陷及髋关节退行性改变。Weinstein 等^[1]对激素性股骨头坏死的细胞凋亡检测研究结果提示,骨细胞凋亡是激素性股骨头坏死的重要病理机制。而熊明月等^[2]的研究结果也提示骨细胞凋亡在早期激素性股骨头缺血坏死中起重要作用。信号传导及转录激活因子 1 (signal transducers and activators of transcription-1, STAT1) 是重要的凋亡促动子,经磷酸化后可以促进细胞凋亡^[3],但 STAT1 是否参与激素性股骨头坏死的骨细胞凋亡过程? 目前还未见到相关的研究报告。为此,笔者进行了相应的实验研究,现报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验材料 股骨头组织标本取自 2011 年 3 月至 2012 年 11 月在温州医科大学附属第二医院接受治疗的激素性股骨头坏死患者和股骨颈骨折手术患者,共 40 例,男 22 例,女 18 例。除股骨颈骨折患者外,其余患者均有激素类药物使用史,泼尼松最大使用剂量 $60\text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$,用药时间 6~36 个月。

1.2 实验试剂 焦碳酸二乙酯 (diethypyrocar-bonate, DEPC) (Sigma 公司); 10% 中性福尔马林液 (南方雨露实验器材有限公司); 10% 乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) (Amresco 公司); 10% 山羊血清 (Solarbio 公司); 磷酸化 STAT1 (phosphorylation STAT1, p-STAT1) 抗体 (Epitomics 公司); BAC 试剂盒、TUNEL 试剂盒、ELISA 试剂盒 (碧云天公司)。

1.3 实验仪器 MULTISKAN MKS 酶标仪 (Thermo Labsystems 公司); EG1140 石蜡组织包埋机、RM2145 石蜡组织切片机、DM2500 莱卡倒置显微镜 (莱卡公司)。

2 方法

2.1 分组及标本采集 按照激素性股骨头坏死 Ficat

分期法, Ficat I 期和 II 期患者 10 例 (A 组), 股骨头组织标本取自股骨头穿刺活检术; Ficat III 期患者 10 例 (B 组), Ficat IV 期和 V 期患者 10 例 (C 组), 股骨头组织标本取自髋关节置换手术; 股骨颈骨折患者 10 例 (D 组), 股骨头组织标本取自股骨颈骨折手术。4 组患者的基线资料比较, 差异无统计学意义 (表 1)。将所有标本均沿冠状面切成 2 份, 1 份经 DEPC 清洗后迅速用液氮冷冻并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 另 1 份浸泡于 10% 中性福尔马林液中。

表 1 4 组患者基线资料比较

组别	性别 (例)		年龄 (岁)
	男	女	
A 组	4	6	43.0 ± 10.4
B 组	6	4	46.2 ± 12.5
C 组	5	5	43.7 ± 11.8
D 组	7	3	47.3 ± 11.2
检验统计量			$F=0.312$
P 值	0.568		0.816

2.2 空骨陷窝率检测 将浸泡于 10% 中性福尔马林液中的标本置入 10% EDTA 彻底脱钙经常规石蜡包埋后,用石蜡切片机沿冠状面作 $5\text{ }\mu\text{m}$ 的切片,常规 HE 染色后封片。在光镜下放大 200 倍观察,每个标本随机选取 3 个视野,计数 200 个骨陷窝来计算空骨陷窝率。

2.3 细胞凋亡率检测 用二甲苯溶液将切片充分脱蜡后,滴加 $20\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 不含 DNase 的蛋白酶,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下作用 30 min,然后用 PBS 液充分洗涤,最后滴加事先按说明书配置好的一步法 TUNEL 检测液。将所有切片在荧光显微镜下放大 200 倍观察,每个标本随机选取 3 个视野,同视野下总细胞数目通过调转为光镜进行计数,计算细胞凋亡率。

2.4 p-STAT1 定性检测 切片常规脱蜡至水及抗原修复后,使用 10% 山羊血清封闭并在室温下孵育

10 min, 然后滴加 1:200 的 p-STAT1 抗体稀释液, 37℃ 下孵育 2 h, 以 PBS 液充分清洗, 滴加二抗后在 37℃ 下再孵育 30 min。最后使用 DAB 液进行染色。用光镜观察, 每张切片随机选取 3 个视野并使用 Image J 软件计算阳性百分比。最终结果以 D 组结果为参考值, 以倍数的形式表达。

2.5 p-STAT1 定量检测 取 -80℃ 下保存的新鲜股骨头组织并在冰浴下充分碾磨, 加组织裂解液迅速裂解后首先使用 BAC 试剂盒对总蛋白进行检测。ELISA 实验步骤如下: 配置标准品及适当稀释待测样品, 将标准品或样品各取 100 μL 并依次滴入孔中, 37℃ 孵育 40 min, 充分洗涤后每孔滴加 50 μL 蒸馏水及一抗工作液, 37℃ 孵育 20 min 后充分洗涤, 滴加 100 μL 酶标工作液, 37℃ 孵育 10 min, 洗涤后滴加 100 μL 底物工作液, 暗处孵育 15 min, 最后滴加 100 μL 终止液。检测结果通过酶标仪在 450 nm 下测吸光值

进行比较。p-STAT1 结果以 D 组结果为参考值, 以倍数的形式表达。

2.6 数据统计学处理 采用 SPSS19.0 软件对所得数据进行统计分析, 4 组患者性别的组间比较采用确切概率法检验, 年龄、空骨陷窝率、细胞凋亡率、p-STAT1 定性及定量检测结果的组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Dunnett's *t* 检验, 细胞凋亡率与空骨陷窝率和 p-STAT1 表达量的相关性分析采用 Spearman 等级相关分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 空骨陷窝率检测结果 在光镜下 D 组中骨细胞填充大部分骨陷窝, 空骨陷窝少见; A、B 组空骨陷窝较 D 组明显增多, C 组可见大面积空骨陷窝 (图 1)。4 组患者股骨头空骨陷窝率比较, 差异有统计学意义; A 组空骨陷窝率高于 D 组 ($P = 0.000$), B 组高于 A 组 ($P = 0.000$), C 组高于 B 组 ($P = 0.000$)。见表 2。

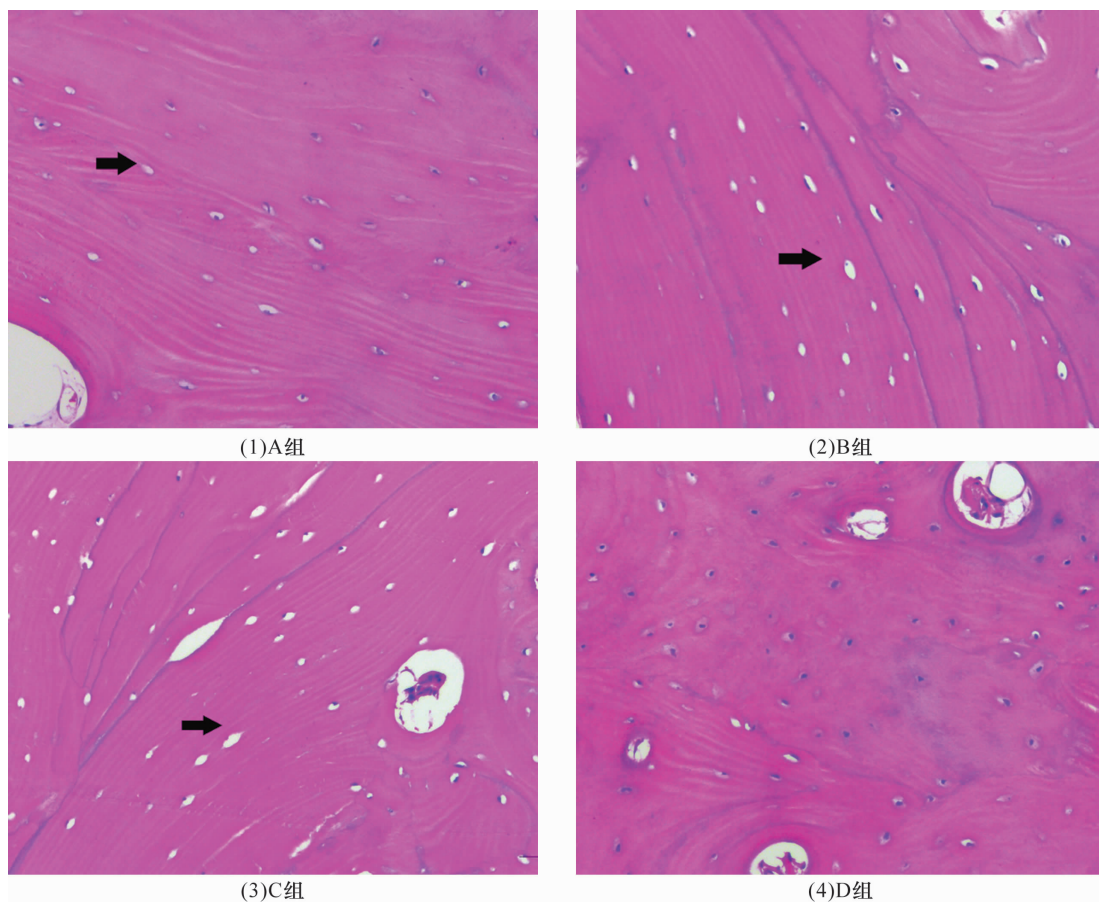


图 1 4 组患者股骨头组织学检查光镜片 (HE 染色 ×200)

图中黑色箭头指向空骨陷窝

3.2 细胞凋亡率检测结果 4 组患者股骨头细胞凋亡率比较, 差异有统计学意义。A 组和 D 组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.209$); B 组高于 A 组 ($P =$

0.000), C 组高于 B 组 ($P = 0.000$)。见表 2。

3.3 p-STAT1 定性检测结果 免疫组化实验结果显示, p-STAT1 蛋白表达于细胞质中, 并且随病变进展

其表达量呈增长趋势(图 2)。4 组患者股骨头 p-STAT1 定性检测结果比较,差异有统计学意义。A 组

高于 D 组($P=0.000$),B 组高于 A 组($P=0.000$),C 组高于 B 组($P=0.000$)。见表 2。

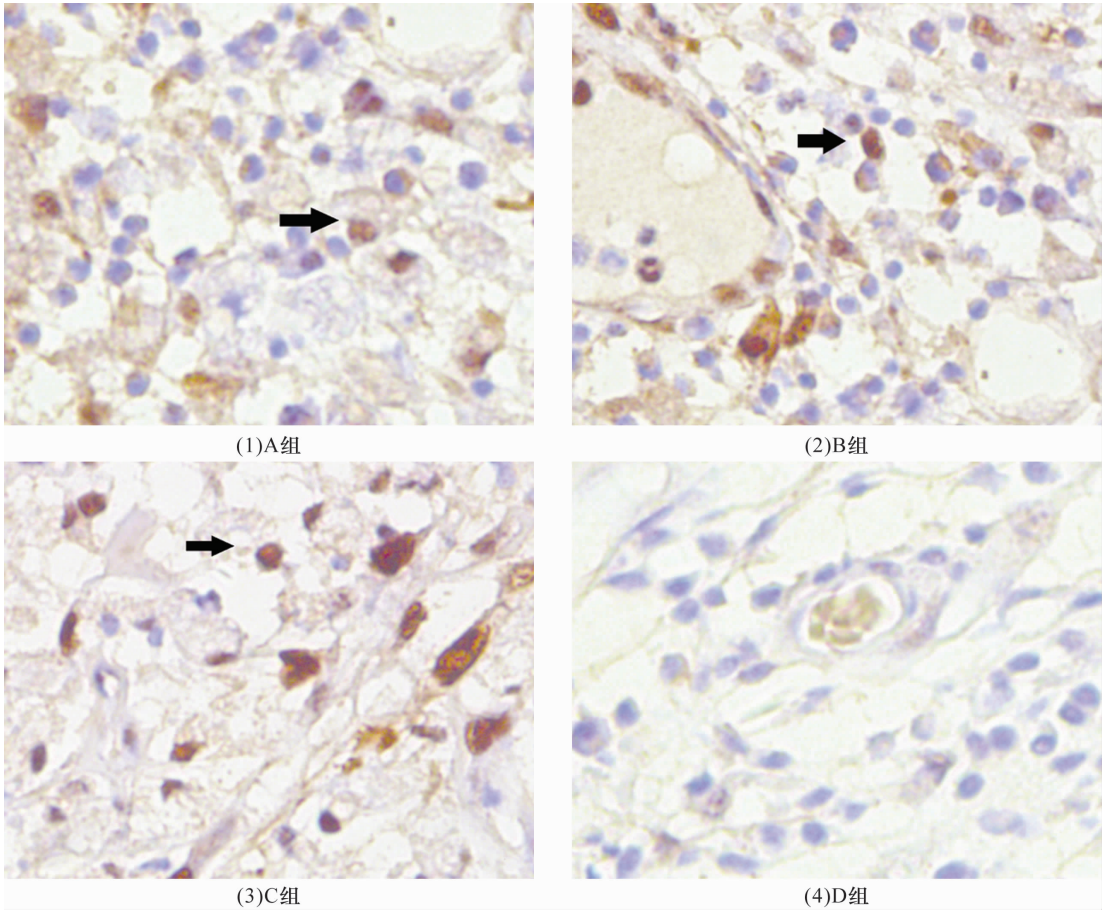


图 2 4 组患者股骨头组织学检查光镜片 (免疫组化染色 ×200)

图中黑色箭头指向 p-STAT1 阳性细胞

3.4 p-STAT1 定量检测结果 4 组患者股骨头 p-STAT1 定量检测结果比较,差异有统计学意义。A 组

高于 D 组($P=0.000$),B 组高于 A 组($P=0.000$),C 组高于 B 组($P=0.000$)。见表 2。

表 2 4 组患者股骨头空骨陷窝率、细胞凋亡率、p-STAT1 定性及定量检测结果

组别	空骨陷窝率(%)	细胞凋亡率(%)	p-STAT1 定性检测	p-STAT1 定量检测
A 组	29.10 ± 6.14	5.70 ± 3.27	3.15 ± 0.82	1.86 ± 0.43
B 组	54.10 ± 7.33	36.90 ± 9.53	5.97 ± 1.01	5.04 ± 2.24
C 组	75.25 ± 7.80	70.30 ± 13.63	8.56 ± 0.94	11.14 ± 2.49
D 组	7.20 ± 1.32	2.80 ± 2.57	1.00 ± 0.56	1.00 ± 0.28
F 值	227.614	136.004	150.005	73.466
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

3.5 相关性分析结果 Spearman 等级相关分析结果显示,空骨陷窝率和细胞凋亡率呈正相关($r_s = 0.882, P=0.000$),细胞凋亡率和 p-STAT1 表达量呈正相关($r_s = 0.860, P=0.000$)。

4 讨论

细胞凋亡的过程主要包括凋亡的激发、细胞内凋亡信号传导及调控、凋亡效应分子激活、蛋白及 DNA 分子断裂和细胞死亡。Kothapalli 等^[4]用猪制作股骨

头缺血动物模型,检测股骨头细胞凋亡情况,发现股骨头缺血 2 ~ 14 d 后在股骨头组织内出现明显的细胞凋亡,认为骨细胞凋亡是股骨头缺血性坏死发生的重要机制。Li 等^[5]发现,激素作用后的骨组织早期先出现局部的细胞坏死和凋亡。光镜下骨细胞死亡最终往往以空骨陷窝的形式出现,因此可用空骨陷窝率反映细胞死亡状况^[6]。本研究中激素性股骨头坏死不同阶段的空骨陷窝率比较结果提示,不同阶段的细

胞死亡状况差异明显,这与以往的报道相符合。使用 TUNEL 法对标本进行细胞凋亡检测,尽管 A 组和 D 组相比,差异无统计学意义,但是 B 组和 C 组细胞凋亡率增加明显,整体上呈现出增长趋势,提示细胞凋亡程度随着病变进展而日趋明显。为了明确激素性股骨头坏死过程中骨细胞死亡和骨细胞凋亡间的关系,我们进一步将空骨陷窝率和细胞凋亡率间做了相关性分析,结果提示二者存在高度正相关性,证明骨细胞凋亡是激素性股骨头坏死的重要过程。

STAT1 有 2 个磷酸化位点,包括酪氨酸磷酸化以及丝氨酸磷酸化位点,其磷酸化后的形式能促进细胞凋亡^[7]。我们通过免疫组化实验对 p-STAT1 进行定性检测,结果显示各组间差异明显,且呈增长趋势,提示 p-STAT1 蛋白量随着疾病进展逐步增加。而通过 ELISA 法对 p-STAT1 蛋白量进行的定量检测也得出了同样的结论。而 p-STAT1 蛋白量和细胞凋亡率间也存在高度正相关性,说明 p-STAT1 可能参与了激素性股骨头细胞凋亡的过程。

本研究的结果提示,骨细胞凋亡是激素性股骨头坏死的重要过程,并且 STAT1 可能在该过程中发挥了重要作用。同时,我们也将在今后的研究中通过动物实验及细胞培养等手段进一步验证我们的结论。

5 参考文献

- [1] Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid - induced osteonecrosis of the hip [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(8): 2907 - 2912.
- [2] 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 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(3): 262 - 265.
- [3] Kostanian IA, Vonarshenko AV, Lipkin VM. STAT1: a many - sided transcription factor [J]. Bioorg Khim, 2010, 36(1): 15 - 28.
- [4] Kothapalli R, Aya - ay JP, Bian H, et al. Ischaemic injury to femoral head induces apoptotic and oncotic cell death [J]. Pathology, 2007, 39(2): 241 - 246.
- [5] Baofeng L, Zhi Y, Bei C, et al. Characterization of a rabbit osteoporosis model induced by ovariectomy and glucocorticoid [J]. Acta Orthop, 2010, 81(3): 396 - 401.
- [6] James J, Steijn - Myagkaya GL. Death of osteocytes. Electron microscopy after in vitro ischaemia [J]. J Bone Joint Surg Br, 1986, 68(4): 620 - 624.
- [7] Himpe E, Kooijman R. Insulin - like growth factor - I receptor signal transduction and the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK - STAT) pathway [J]. Biofactors, 2009, 35(1): 76 - 81.