维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)03－0313－03

早期酒精性股骨头缺血坏死骨细胞凋亡的实验研究

郭坤亮，安　洪，蒋电明，邓忠良，刘传康，李宏宇

(重庆医科大学临床学院骨科，重庆　400016)

【摘　要】目的：探讨细胞凋亡在早期酒精性股骨头缺血坏死中的意义。方法：采用灌胃法，给予实验组家兔含乙醇 50% 的烈性白酒 8mL(kg·d)1～6 月，对照组给予等量生理盐水；观察股骨组织学变化，用末端原位标识(TUNEL)法检测骨细胞凋亡。结果：2 个月时实验组凋亡细胞数(107.60‰±25.87‰)明显高于对照组($P<0.01$)，并随着时间推移，凋亡细胞逐渐增多；与对照组(10.69%±3.11%，11.24%±2.64%)相比，3、6 个月时实验组空骨陷窝百分比(16.61%±3.60%，27.93%±3.06%)明显增加($P<0.05$，$P<0.01$)。透射电镜发现部分胃细胞核膜完整、染色质浓集、电子密度增加的凋亡特征。结论：细胞凋亡在早期酒精性股骨头缺血坏死中起重要作用。

【关键词】细胞凋亡；酒精；股骨头；坏死

【中国图书分类法分类号】R681.8　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－07－22

An experiment study on apoptosis in alcohol－induced early avascular necrosis of the femoral head

GUO Kunliang, et al

(*Department of Orthopaedics; College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the significance of osteocyte apoptosis in alcohol－induced avascular necrosis of the femoral head. *Methods*: The experimental group was administered the wine containing 50% of alcohol with dosage of 8 mL/(kg.d) and isodose NS as controls by pouring into stomach with a plastic tube for 1 to 6 months, to observe the changes of histology in the femoral head and to study osteocytes apoptosis by means of TdT－mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL). *Results*: The number of apoptosis in the experimental group (107.60‰±25.87‰) was significantly higher than the control ($P<0.01$) in second month. With the passing of the time, osteocytes apoptosis progressively increased. In third and sixth month, the percentage of empty osteocyte lacunae in the experimental group was increased remarkably to 16.61%±3.60% and 27.93%±3.06%, respectively, compared with the controls (10.69%±3.11%, 11.24%±2.64%) ($P<0.05$, $P<0.01$). The transmissible electron microscope study of the osteocyte apoptosis showed that characteristics included intact nuclear membrane, condensed chromatin and increased electron dense. *Conclusion*: Osteocytes apoptosis may play a key role in the process of alcohol－induced early avascular necrosis of the femoral head.

【Key words】Apoptosis; Alcohol; Femoral head; Necrosis

酒精性股骨头缺血性坏死(avascular necrosis of the femoral head, ANFH)是非创伤性 ANFH 的常见病因之一，空骨陷窝是骨细胞死亡的重要标志，但发病机理尚不清楚[1～5]。长期大量饮酒引起全身性多源性损害，内分泌紊乱、营养代谢障碍和微量元素缺乏是慢性酒精中毒的重要发病机制，与细胞凋亡密切相关[6～11]。据此，观察酒精性 ANFH 过程中骨细胞凋亡和空骨陷窝变化，探讨细胞凋亡在酒精性 ANFH 中的作用。

作者介绍：郭坤亮(1966－　)，男，主治医师，博士研究生，主要研究方向：酒精中毒的发病机制和防治。

1　材料与方法

1.1　动物分组和模型制作

1.1.1　动物分组　选用健康雄性新西兰白兔 60 只(重庆医科大学动物中心提供)体重 2.14±0.3[1]kg 只，随机分为 2 组，每组 30 只，分别为 4 期，Ⅰ期为 1 个月 6 只，Ⅱ期为 2 个月 6 只，Ⅲ期为 3 个月 6 只，Ⅳ期为 6 个月 12 只。

1.1.2　模型制作　采用灌胃法，家兔俯卧固定于专用固定架上，将自制开口器置入兔口腔、胃管末端经开口器随动物吞咽动作轻轻插入，长度 13～16cm，胃管另端置入水中，观

维普资讯 http://www.cqvip.com

察 1 分钟无气泡,证实未误插入气管后,用注射器缓慢注入液体灌胃,实验组给予含乙醇 50% 的烈性白酒 8ml(kg·d);对照组给予等体积的生理盐水。平衡饲料,在同一条件下单笼饲养,各组按分期分批处死送检。

1.2 细胞凋亡检测

采用 TUNEL,试剂盒购自德国宝灵曼公司,方法参照说明书略加改动。主要步骤为:(1)石蜡切片常规脱水;(2)蛋白酶 K(5μg/ml),室温 15min;(3)3% H_2O_2、甲醇,室温 10min;(4)在冰上加含 0.1 TritonX-100 的 0.1% 枸橼酸钠,2min;(5)Tunel 反应液 50μl,湿盒 37℃ 孵育 60min;(6)过氧化物(POD)50μl 湿盒 37℃ 孵育 30min;(7)DAB 显色 10min。试验设阳性对照与阴性对照染色,当胞核出现黄色颗粒为阳性细胞(即凋亡细胞)。结果观察:每张玻片上随机选择 10 个区域,每个区域计数 100 个骨细胞,统计出凋亡的细胞数,即为每 1000 个细胞中的细胞凋亡数。

1.3 组织形态学检查

股骨头沿冠状面剖开,再沿冠状面切取 2mm 厚组织作石蜡切片,用 4% 多聚甲醛(pH=7.2)固定 4h,10% EDTA Tris-HCl 脱钙,多聚赖氨酸处理玻片作 HE 染色、细胞凋亡检测。HE 染色切片上随机计数 200 个骨细胞计算空骨陷窝所占百分比。

1.4 透射电镜检查

各组第 3、6 个月动物各取 2 只股骨头软骨及软骨下区 2mm×2mm×1mm 组织,用 2.5% 戊二醛前固定,10% EDTA Tris-HCl 缓冲液(pH=7.4)脱钙,1% 饿酸后固定,环氧树脂包埋,制作超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅染色,日立 600 型电镜观察。

1.5 统计学分析

数据均用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数字用 SPSS10.0 软 t 值检验;两指标间相关性用简单相关及直线回归,$P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 骨细胞凋亡

实验组细胞凋亡增多,并以软骨下区最为明显,2 个月时为(107.60‰±25.87‰)明显高于对照组(46.23‰±23.00‰)($P<0.01$);6 个月时高达 392.56‰±26.39‰,比对照组(44.09‰±24.26‰)升高近 8 倍,两组间差异有高度显著性($P<0.01$)(见表 1)。

2.2 组织学变化

两组家兔股骨头外观正常。实验组 6 个月时较对照组松脆,易于取下,提示有骨质疏松。光镜检查见实验组骨髓内造血组织减少,骨原细胞减少,脂肪细胞增多增大;骨小梁明显变细、稀疏伴有部分有断裂;骨小梁出现空骨陷窝。以软骨下区最为明显。但未能见到坏死修复反应。与对照组比较,实验组空骨陷窝计数第 3 个月出现增多,6 个月时更加明显,两组间差异有显著性($P<0.01$)(见表 2)

表 1 不同时间股骨头骨凋亡细胞计数

时间(月)	凋亡细胞指数(‰) 对照组	实验组
1	46.83±27.34	50.04±28.12
2	46.23±23.00	107.60±25.87
3	41.56±22.85	195.53±15.72
6	44.09±24.26	392.56±26.39

注:同期实验组与对照组相比较 a:$P>0.05$; b:$P<0.05$;c:$P<0.01$

表 2 不同时间股骨头骨细胞空骨陷窝计数

时间(月)	空骨陷窝计数 实验组	对照组
1	10.34±2.49	8.87±1.98
2	11.89±2.73	10.33±2.82
3	16.61±3.60	10.69±3.11
6	27.93±3.06	11.24±2.64

注:同期实验组与对照组相比较 a:$P>0.05$; b:$P<0.05$;c:$P<0.01$

2.3 空骨陷窝与细胞凋亡之间的相关性

实验组骨细胞凋亡数与空骨陷窝计数呈明显的正相关性($y=-129.61+16.90x$, $r=0.62$, $tr=15.72$, $P<0.01$),提示早期酒精性 ANFH 与细胞凋亡有关。

2.4 透射电镜观察

对照组骨细胞电镜下核膜完整,染色质均匀,核占细胞的 1/3 左右。实验组的骨细胞则细胞核体积缩小,染色质呈边聚现象,但核膜仍完整,即早期凋亡细胞特征有的染色质更浓密,电子密度增加,结构模糊不清,但核膜仍完整,具有中、晚期凋亡细胞的特点。

3 讨 论

以往的观点认为酒精性 ANFH 是由于脂质代谢紊乱、骨内压增高以及潜在性血管炎和前凝状态引起骨细胞坏死,骨细胞出现空骨陷窝[1-5]。透射电镜可见实验组骨细胞有不同程度的核体积缩小、染色体固缩、边聚、电子密度增加和核膜完整等凋亡特征,提示早期酒精性 ANFH 存在骨细胞凋亡。

维普资讯 http://www.cqvip.com

TUNEL 法检测 2 个月时凋亡细胞数明显高于对照组,并且随着时间推移,凋亡细胞逐渐增多,与空骨陷窝增多呈正相关性;以软骨下区最为明显,与空骨陷窝改变部位置相一致。说明骨细胞凋亡在早期酒精性 ANFH 起着重要作用,但其机理目前尚不清楚,可能与以下因素有关:1. 糖皮质激素是一种细胞凋亡诱导剂,促使成骨细胞和骨细胞凋亡,导致骨细胞减少[6];同时还影响成骨细胞功能,使成骨形作用延迟,造成骨丢失[7]。酒精中毒引起内源性糖皮质激素分泌大量增加,介导细胞凋亡。2. 酒精直接毒性作用对肝细胞损害,锌代谢紊乱[8]。锌元素与多种酶、核酸、蛋白合成密切相关,锌元素缺乏引起细胞周期紊乱导致细胞凋亡[9]。3. 慢性酒精中毒者长期饮食减少,甚至以酒代饭,影响胃肠功能,干扰营养物质的消化、吸收和代谢[10],加重酒精中毒引起的脂质过氧化,促进细胞凋亡[11]。

综上所述,细胞凋亡在酒精性 ANFH 的发生发展过程中起着重要作用。

参 考 文 献

[1] Solomon L, Schntzler H, Seftel H et al. Alcoholic osteonecrosis: an attempted experimental model in the adult rat. in: Arlet J. Ficat RP. Hungerford DS ed[J]. Bone Circulation Baltimore. Williams&Wilkins, 1984:238.

[2] Shih CH, Yang WE, Lee ZI et al. Effect of long-term alcohol on the femoral head of rabbit[J]. Formos Med Assoc, 1991;90:443.

[3] 正义生,毛克亚,李月白. 酒精性股骨头缺血坏死发病机理的实验研究[J]. 中华骨科杂志,1998;18:231.

[4] Wang GJ, Sweet DE Reger SI, et al. Fat-cell changes as a mechanism of avascular necrosis of the femoral head in cotisone-treated rabbit[J]. Bone josurg(Am), 1977;59:729.

[5] Solonmon, J Clinical and therapeutic concepts in ischemic femur head necrosis[J]. Orthopade. 1990;19:200.

[6] Weinstein RS. Jilka RL. Parfitt AM, et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocortocoids[J]. Clin Invest, 1998;102:274~282.

[7] Parfitt AM, Villanueva AR, Foldes J et al. Relations between histologic indices of bone formation: implications for the pathogenesis of spinal osteoporosis[J]. Bone Miner Res. 1995;10:466~473.

[8] Sharma G. Sandhir R. et al. Effect of ethanol on cadmium uptake and metabolism of zinc and copper in rats exposed to cadmium[J]. Nutr 1991;121:87.

[9] John M, Rogers J. Zinc deficiency causes apoptosis but not cell cycle alterations in organogenesis stage rat embryos[J]. Teratology, 1995;52:149.

[10] Thuluvath PJ. Triger DR. Evaluation of nutritional status by using anthropometry in adults with alcoholic and nonalcoholic liver disease[J]. AM Clin Nutr, 1994;60:269.

[11] Schlorff E C, Husain K, Somani S M. Dose and time dependent effects of ethanol on antioxdant system in rat testes[J]. Alcohol. 1999;18(2-3):203-14.

(上接第 278 页)

overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma [J]. Am J Gastroenterol, 1999;94:451-455.

[6] Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells[J]. Cell, 1998;93:705-716.

[7] Ohta Y, Watanabe Y, Murakami S, et al. Vascular endothelial growth factor and lymph node metastasis in primary lung cancer[J]. Br J Cancer, 1997;75:1041-1045.

[8] Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptosis: a different type of cell death[J]. FASEB J, 1992;6:2450-2455.

[9] Waston AJ. Chemopreventive effects of NSAIDs against colorectal cancer: regulation of apoptosis and mitosis by COX-1 and COX-2[J]. Histopathology, 1998;13:591~597.

[10] Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of gastric cancer xenografts via induction of apoptosis in nude mice[J]. Am J Physiol 1998;274(6), 1061-1067.

[11] Tsujii M, Dubois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2 [J]. Cell, 1995;83:49-501.

[12] Williams CS, Smalley W, Dubois RN. Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention [J]. J Clin Invest, 1997;100:1325-1329.