

## 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\*☆

暴淑英<sup>1</sup>, 赵庆国<sup>2</sup>, 毕黎琦<sup>3</sup>

### Changes in apoptosis related gene expression following alendronate intervention in the early stage of steroid-induced necrosis of the femoral head

Bao Shu-ying<sup>1</sup>, Zhao Qing-guo<sup>2</sup>, Bi Li-qi<sup>3</sup>

#### Abstract

**BACKGROUND:** The research demonstrates that steroid-induced necrosis of femoral head may caused by osteocytes apoptosis rather than ischemic necrosis.

**OBJECTIVE:** To investigate the expression of bcl-2 and cysteinyl aspartate specific protease 3 (caspase-3) and intervention effect of alendronate sodium in femoral head of steroid-induced necrosis in rats.

**DESIGN, TIME AND SETTING:** A randomized controlled animal study was performed in the Pathological Laboratory, Basic Medical School of Jilin University between March 2006 and February 2007.

**MATERIALS:** 100 healthy Wistar rats were randomly divided into the normal control, glucocorticoid model, propylene glycol alginate sodium sulfate (PSS), alendronate sodium and PSS combined with alendronate groups, with 20 rats in each. The alginic sodium diester tablets were provided by the Dongfeng Pharmaceutical Factory, and alendronate sodium was supplied by the Hangzhou MSD Pharmaceutical Co., Ltd.

**METHODS:** Hydrocortisone acetate was injected into all rats using intraglutal injection to produce necrosis models of bone cells of femoral head with the exception of the normal control group. The rats were drench with PSS, alendronate sodium, and PSS combined with alendronate in related groups, respectively. The experiment was performed 6 consecutive weeks with intramuscular administration once per week and drench administration once time per day. All rats were forced to stand at intervals four hours per day.

**MAIN OUTCOME MEASURES:** Pathology changes of femoral head were observed under light microscope. The expression of bcl-2 and caspase-3 were detected by immunohistochemical method.

**RESULTS:** Compared with the normal control group at 4 weeks after administration, phenomenon of femoral head necrosis was clear in the glucocorticoid model group, the spongy bone trabecula turned thinner or broke, the number of empty lacuna was obvious increased ( $t=2.629, P<0.01$ ). The number of bone trabecula and empty lacuna in the PSS group lies between the normal control and the glucocorticoid model groups ( $t=1.713, P<0.01$ ). However, the number of bone trabecula and empty lacuna in the alendronate sodium and PSS combined with alendronate group was near to that of the control group ( $t=1.462, t=1.657, P>0.05$ ). Compared with the glucocorticoid model, bcl-2 positive cell rate was obvious increased in the PSS, alendronate sodium and PSS combined with alendronate groups ( $t=2.146, P<0.05; t=2.815, P<0.01; t=2.947, P<0.01$ ), the caspase-3 positive cell rate was significantly decreased ( $t=2.97, P<0.01; t=2.462, P<0.01; t=1.854, P<0.05$ ), especially in the alendronate sodium and PSS combined with alendronate groups.

**CONCLUSION:** A large dose of hormone may cause avascular necrosis of femoral head by decreasing expression of bcl-2 and increasing caspase-3. While alendronate sodium can prevent femoral head steroid-induced necrosis from osteocytes apoptosis by regulating expressions of bcl-2 and caspase-3.

Bao SY, Zhao QG, Bi LQ. Changes in apoptosis related gene expression following alendronate intervention in the early stage of steroid-induced necrosis of the femoral head. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu 2008;12(46):9095-9099(China) [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

#### 摘要

**背景:** 近年研究发现激素性股骨头坏死病例中凋亡的骨细胞增多, 因此认为激素性股骨头坏死是骨细胞凋亡所致, 而并非缺血性坏死。

**目的:** 观察大鼠激素性股骨头坏死早期 bcl-2、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(cysteinyl aspartate specific protease 3, caspase-3)的表达, 以及阿仑磷酸钠的干预效果。

**设计、时间及地点:** 随机对照动物实验, 于 2006-03/2007-02 在吉林大学基础医学院病理实验室完成。

**材料:** 健康 Wistar 大鼠 100 只, 随机分为正常对照组、激素模型组、藻酸双酯钠组、阿仑磷酸钠组、联合用药组, 20 只/组。藻酸双酯钠片为吉林东丰制药厂产品, 阿仑磷酸钠为杭州默沙东制药有限公司产品。

**方法:** 除正常对照组外, 其余 4 组大鼠均给予醋酸泼尼松龙臀肌注射建立激素性股骨头坏死模型。藻酸双酯钠组、阿仑磷酸钠组分别灌服对应药物, 联合用药组灌服藻酸双酯钠+阿仑磷酸钠。各组肌注用药 1 次/周, 灌服药 1 次/d, 实验持续 6 周。所有大鼠均强迫间断站立, 4 h/d。

**主要观察指标:** 光镜观察股骨头病理变化。S-P 免疫组织化学染色法检测股骨头组织 bcl-2、caspase-3 的表达。

**结果:** 给药第 4 周与正常对照组比较, 激素模型组股骨头坏死现象明显, 骨小梁变细甚至断裂, 空骨陷窝数量明显增多( $t=2.629, P<0.01$ ); 藻酸双酯钠组骨小梁和空骨陷窝数量介于前 2 组之间( $t=1.713, P<0.01$ ); 阿仑磷酸钠组、联合用药组骨小梁和空骨陷窝数量接近正常对照组( $t=1.462, t=1.657, P>0.05$ )。与激素模型组比较, 藻酸双酯钠组、阿仑磷酸钠组、联合用药组股骨头组织 bcl-2 阳性细胞率均明显升高( $t=2.146, P<0.05; t=2.815, P<0.01; t=2.947, P<0.01$ ), caspase-3 阳性细胞率均明显降低( $t=2.97, P<0.01; t=2.462, P<0.01; t=1.854, P<0.05$ ), 其中阿仑磷酸钠组及联合用药组升高尤为明显( $t=2.503, t=1.959, P<0.05$ )。

**结论:** 大剂量激素可能通过抑制 bcl-2 表达和促进 caspase-3 表达引起股骨头坏死。阿仑磷酸钠可能通过与其相反的途径来防止骨细胞凋亡, 从而预防早期激素性股骨头坏死。

**关键词:** 激素性股骨头坏死; 早期; 骨细胞凋亡; bcl-2; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3

暴淑英, 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[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(46):9095-9099 [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

<sup>1</sup>Department of Rheumatology and Immunology, Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China;

<sup>2</sup>Department of Orthopaedics, Changchun People's Hospital, Changchun 130021, Jilin Province, China;

<sup>3</sup>Department of Rheumatology and Immunology, China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Bao Shu-ying☆, Doctor, Associate chief physician, Department of Rheumatology and Immunology, Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China  
baoshuying@163.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No.30170887\*

Received: 2008-08-06  
Accepted: 2008-10-29

<sup>1</sup> 厦门大学附属中山医院风湿免疫科, 福建省厦门市 361004; <sup>2</sup> 长春市人民医院骨科, 吉林省长春市 130031; <sup>3</sup> 吉林大学中日联谊医院风湿免疫科, 吉林省长春市 130031

暴淑英\*, 女, 1966 年生, 吉林省榆树市人, 汉族, 2007 年吉林大学第三临床医学院毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事激素性股骨头坏死方面的研究。  
baoshuying@163.com

国家自然科学基金资助项目 (30170887)\*

中图分类号: R681  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2008)46-09095-05

收稿日期: 2008-08-06  
修回日期: 2008-10-29  
(54200808090004/  
ZS·Z)

## >> 本文导读 <<

**课题背景:** 课题受国家自然科学基金资助, 项目编号 30170887, 主要研究激素性股骨头坏死的早期预测、早期发病机制以及早期预防, 目前已经部分结题, 发现骨细胞凋亡参与了激素性股骨头坏死的发病, *bcl-2*、*caspase-3* 可能为骨细胞凋亡的机制; 联合用药可能通过抑制骨细胞凋亡途径预防激素性股骨头坏死的发生; 阿仑磷酸钠可能通过抑制 *bcl-2*、*caspase-3* 的表达来抑制骨细胞凋亡, 从而预防激素性股骨头坏死; 藻酸双酯钠虽然也有此作用, 但作用较弱。

**应用要点:** 选题方面, 关于激素引起骨细胞凋亡的机制研究报道少见。操作方面, 造模前强迫大鼠间断站立, 增加股骨头负重促其坏死, 缩短了成模时间。

**偏倚或不足:** 受条件的限制, 实验选取动物数量较少, 观察时间尚短, 所得结果需经过大量的基础或临床实验加以验证。

## 0 引言

激素性股骨头坏死早期无任何症状, 一旦出现症状即已无法逆转, 且发病率逐年增高<sup>[1-2]</sup>, 但关于其具体的发病机制目前还不十分清楚, 防治方面仍无理想的措施。以往研究均认为激素性股骨头坏死是由于激素通过导致脂代谢紊乱、血管内凝血、骨内高压、骨质疏松及血管病变等过程, 最终造成股骨头缺血后坏死<sup>[3-7]</sup>。近年来, 国外学者发现在激素性股骨头坏死的骨组织中存在大量的凋亡细胞<sup>[8-9]</sup>, 因此提出骨细胞凋亡可能导致激素性股骨头坏死。

分子生物学研究已经逐步阐明了许多基因表达与细胞凋亡相关<sup>[10-11]</sup>, 其中包括 *bcl-2* 基因家族和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (cysteiny aspartate specific protease 3, *caspase-3*) 基因家族。 *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。细胞凋亡发生的核心机制是 *caspase* 家族的活化, 该家族在细胞凋亡中起主要执行者的任务, 其中 *caspase-3* 亦被称为死亡蛋白酶, 在细胞凋亡中处于核心位置。实验探讨激素性股骨头坏死后 *bcl-2*、*caspase-3* 表达的变化, 以进一步明确激素性股骨头坏死的发病机制。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 于 2006-03/2007-02 在吉林大学基础医学院病理实验室完成。

**材料:** 选取健康 4 月龄 Wister 大鼠 100 只, 雌雄各半, 体质量 (200±20) kg, 随机分为正常对照组、激素模型组、藻酸双酯钠组、阿仑磷酸钠组、联合用药组, 20 只/组, 由解放军第二〇八医院动物实验中心提供, 动物质量合格证号:

吉动合证字 113 号, 实验过程中对动物的处置符合 2006 年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定<sup>[12]</sup>。

药品、试剂与仪器	来源
醋酸泼尼松龙注射液 (125 mg, 国药准字 H33020824)	浙江仙琚制药股份有限公司
藻酸双酯钠片 (50 mg, 国药准字 H22020908)	吉林东丰制药厂
阿仑磷酸钠 (10 mg, 国药准字 H20010515)	杭州默沙东制药有限公司
复方氨基酸螯合钙胶囊 (1 g, 国药准字 J20030087)	美国矿维公司
注射用青霉素钠 (160 万 u, 国药准字 H13020655)	华北制药股份有限公司
<i>caspase-3</i> 比色试剂盒	北京中杉金桥生物技术有限公司
<i>bcl-2</i> 免疫组化试剂盒, 正常血清封闭液, 小鼠 IgG (一抗), 亲和纯化抗体, 标记长臂生物素 (二抗), SABC, DAB 显色试剂盒	武汉博士德生物公司
光学显微镜 BH-2, 摄影生物显微镜 BH-2	日本
切片机 LEICARM2135	德国

### 实验方法:

**造模前干预:** 各组动物均在同一条件下单笼饲养, 进食普通饲料, 自然光照, 温度 (18±2) °C, 湿度 50% 左右, 适应喂养 1 周后给药。

**激素性股骨头坏死模型的建立与给药<sup>[13]</sup>:** 正常对照组大鼠给予肌注生理盐水 1 mL, 同时灌服生理盐水 2 mL; 其余 4 组大鼠均造模, 按 24.5 mg/kg 给予醋酸泼尼松龙臀肌注射, 此外激素模型组给予生理盐水 2 mL 灌服, 藻酸双酯钠组给予藻酸双酯钠 50 mg/只灌服, 阿仑磷酸钠组给予阿仑磷酸钠 3.5 mg+复方氨基酸螯合钙胶囊 0.5 g/只灌服, 联合用药组给予藻酸双酯钠 50 mg+阿仑磷酸钠 3.5 mg+复方氨基酸螯合钙胶囊 0.5 g/只灌服。各组肌注用药 1 次/周, 灌服药 1 次/d, 实验持续 6 周。所有大鼠间断强迫站立, 4 h/d。

股骨头病理状态光镜观察: 于实验第2, 3, 4, 5, 6周末, 每组取2只大鼠, 给予20 g/L利多卡因2 mL腹腔注射麻醉成功后, 剔除后肢股骨头, 用40 g/L甲醛固定液4 °C固定4 d, 流水冲洗12 h, 然后用EDTA 37 °C对股骨头组织脱钙7 d, 梯度乙醇脱水, 常规石蜡包埋, 沿股骨头冠状面切片、二甲苯脱蜡, 将每个股骨头切片后做苏木精-伊红染色。光镜下观测骨小梁、骨髓造血细胞、脂肪细胞、成骨细胞、破骨细胞、空骨陷窝等。随机任选3个高倍视野, 每个视野计数50个空骨陷窝, 即空缺的空骨陷窝个数, 求出空缺的骨陷窝占正常陷窝的百分数, 即平均骨陷窝的空虚率(即空骨陷窝率)。并用生物显微镜摄片。

激素性股骨头坏死判定标准: 股骨头软骨下区空骨陷窝率作为激素性股骨头坏死的组织学判定指标已被广泛采用。正常成年家兔股骨头软骨下区空骨陷窝率为8%~12%, 同等制片条件下股骨头软骨下空骨陷窝率超过此数目即提示骨坏死<sup>[14-16]</sup>。

股骨头组织bcl-2表达免疫组化染色检测: 取实验第4周各组股骨头组织切片, 采用S-P免疫组织化学染色方法检测bcl-2的表达情况, 方法参照试剂盒说明进行。摄影生物显微镜下观察, 以已知阳性染色切片为阳性对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照, 染棕黄色为阳性, 并摄片, 计数各组第4周每10<sup>3</sup>个骨细胞中阳性细胞数。

股骨头组织caspase-3的表达免疫组化染色检测: 取实验第4周各组股骨头组织切片, 采用S-P免疫组织化学染色方法检测caspase-3的表达情况, 方法参照试剂盒说明进行。摄影生物显微镜下观察, 以已知阳性染色切片为阳性对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照, 染棕黄色颗粒为阳性, 观察每张切片10个具有代表性的高倍视野, 细胞浆染为棕黄色为阳性。根据胞浆的染色程度进行评分: 染色强度弱者(淡黄色或仅个别细胞呈黄至棕黄色染色)为1分, 染色强度强者(呈黄至棕黄色染色)为3分, 中等染色强度者(染色强度介于前两者之间)为2分。根据着色细胞百分率进行评分: 着色细胞占计数细胞百分率<1%为0分, 1%~25%为1分, 26%~50%为2分, 51%~75%为3分, >75%为4分。将每张切片染色强度得分与着色细胞百分率得分各自相乘, 为其最后得分。得0分为阴性(-), 1~2分为弱阳性(+), 3~4分为中等阳性(++), 6分及以上为强阳性(+++)。并摄片。

主要观察指标: ①股骨头病理观察结果。②股骨头组织bcl-2及caspase-3表达免疫组化染色结果。

设计、实施、评估者: 设计为第一作者, 干预实施为第一、二作者, 评估为第三作者, 均经过系统培训, 未使用盲法评估。

统计学分析: bcl-2数据由第二作者经SPSS11.0软件处理, 组间行 $t$ 检验比较,  $P < 0.01$ 有显著差异。caspase-3数据由第二作者应用 SPSS11.0 软件进行分析, 两样本

率差异检验用四格表Fisher确切概率法; 所得定量资料采用 $t$ 检验, 方差不齐时行 $t'$ 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 给药第4周股骨头病理观察结果

#### 正常对照组:

骨小梁结构清晰、粗大、排列规则, 脂肪细胞少见, 成骨细胞排列规则, 偶见空骨陷窝, 髓腔内造血细胞丰富, 见图 1a。

#### 激素模型组:

骨小梁明显稀疏、变细, 甚至断裂, 结构模糊; 髓腔内脂肪细胞增多、肥大; 造血细胞数量减少; 成骨细胞排列不规则; 空骨陷窝数量明显多于正常对照组 ( $t=2.629$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 1b。

#### 藻酸双酯钠组:

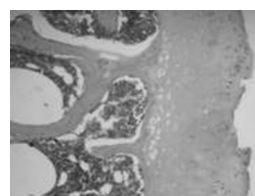
脂肪细胞少见, 造血细胞多见, 骨小梁和空骨陷窝数量介于前2组之间 ( $t=1.713$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 1c。

#### 阿仑磷酸钠组:

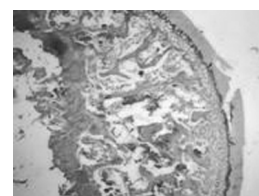
骨小梁和空骨陷窝数量接近正常对照组 ( $t=1.462$ ,  $P > 0.05$ ), 脂肪细胞和造血细胞接近激素模型组, 见图 1d。

#### 联合用药组:

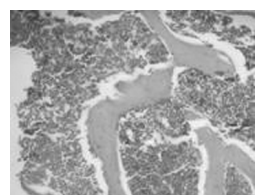
骨小梁接近完整, 造血细胞丰富, 脂肪细胞少, 空骨陷窝数接近正常对照组 ( $t=1.657$ ,  $P > 0.05$ ), 见图 1e。



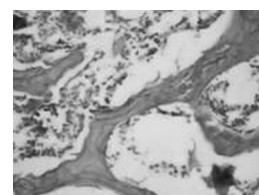
a: Normal control group ( $\times 400$ )



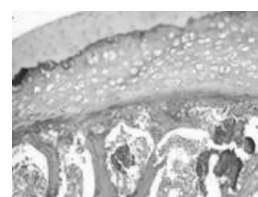
b: Glucocorticosteroid group ( $\times 200$ )



c: PSS group ( $\times 400$ )



d: Alendronate group ( $\times 400$ )



e: PSS combined with alendronate group ( $\times 200$ )

Figure 1 The pathologic results of the femoral head at 4 weeks after administration (Hematoxylin-eosin staining)

图 1 给药第4周各组股骨头病理观察结果(苏木精-伊红染色)



## 2.2 给药第4周股骨头组织bcl-2的表达

### 股骨头组织 bcl-2 阳性细胞率:

正常对照组、激素模型组、藻酸双酯钠组、阿仑磷酸钠组、联合用药组分别为(28.47±1.63)%, (11.67±3.74)%, (19.42±2.81)%, (23.36±5.17)%, (26.96±6.64)%。

### 与正常对照组比较:

激素模型组、藻酸双酯钠组股骨头组织 bcl-2 阳性细胞率均明显降低( $t=3.052$ ,  $P<0.01$ ;  $t=2.435$ ,  $P<0.05$ )。

### 阿仑磷酸钠组:

联合用药组股骨头组织 bcl-2 阳性细胞率无明显变化( $t=1.543$ ,  $P>0.05$ ;  $t=1.342$ ,  $P>0.05$ )。

### 与激素模型组比较:

藻酸双酯钠组、阿仑磷酸钠组、联合用药组股骨头组织 bcl-2 阳性细胞率均明显升高( $t=2.146$ ,  $P<0.05$ ;  $t=2.815$ ,  $P<0.01$ ;  $t=2.947$ ,  $P<0.01$ )。

### 与藻酸双酯钠组比较:

联合用药组股骨头组织 bcl-2 阳性细胞率明显升高( $t=2.503$ ,  $P<0.05$ )。

各组股骨头组织bcl-2表达免疫组化染色结果见图

2。

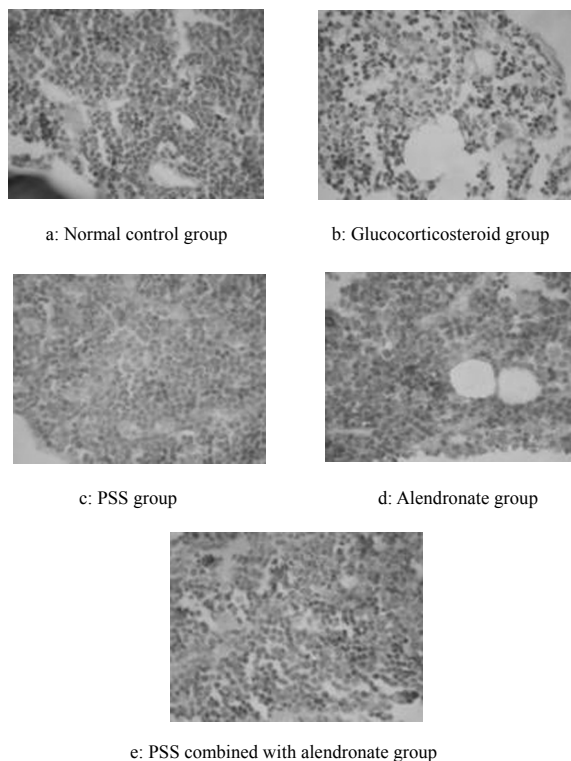


Figure 2 Expression of bcl-2 in the femoral head at 4 weeks after administration (Immunohistochemical staining, ×400)

图2 给药第4周各组股骨头组织中 bcl-2 表达情况(免疫组化染色, ×400)

免疫染色阳性物质呈棕黄色颗粒, 主要位于细胞浆中。

### 正常对照组:

40 个股骨头中, 阴性表达 38 个(95%), 弱阳性表达 2 个(5%), 无中等阳性和强阳性表达, 见图 3a。

### 激素模型组:

40 个股骨头中, 阴性表达 2 个(5%), 阳性表达 38 个(95%), 其中弱阳性表达 2 个(5%), 中等阳性表达 10 个(25%), 强阳性表达 26 个(65%), 见图 3b。

### 藻酸双酯钠组:

40 个股骨头中, 阴性表达 12 个(30%), 阳性表达 28 个(70%), 其中弱阳性表达 8 个(20%), 中等阳性表达 14 个(35%), 强阳性表达 6 个(15%), 见图 3c。

### 阿仑磷酸钠组:

40 个股骨头中, 阴性表达 26 个(65%), 阳性表达 14 个(35%), 其中弱阳性表达 10 个(25%), 中等阳性表达 4 个(10%), 无强阳性表达, 见图 3d。

### 联合用药组:

40 个股骨头中, 阴性表达 36 个(90%), 阳性表达 4 个(10%), 其中弱阳性表达 2 个(5%), 中等阳性表达 2 个(5%), 无强阳性表达, 见图 3e。

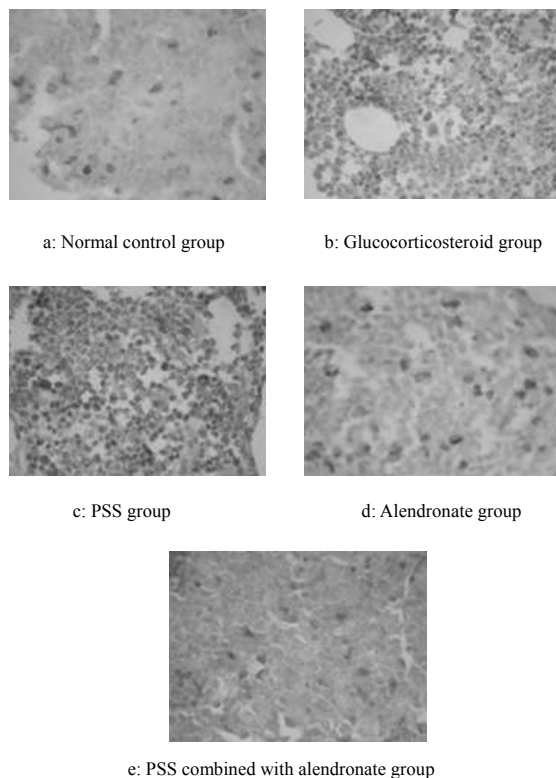


Figure 3 Expression of caspase-3 in the femoral head at 4 weeks after administration (Immunohistochemical staining, ×400)

图3 给药第4周各组股骨头组织中 caspase-3 表达情况 (免疫组化染色, ×400)

## 2.3 给药第4周股骨头组织caspase-3的表达 caspase-3

**与正常对照组比较:**

激素模型组、藻酸双酯钠组股骨头组织 caspase-3 阳性细胞率均明显升高( $t=2.431$ ,  $P<0.01$ ;  $t=1.963$ ,  $P<0.05$ )。

阿仑磷酸钠组、联合用药组股骨头组织 caspase-3 阳性细胞率无明显变化( $t=1.667$ ,  $P>0.05$ ;  $t=1.261$ ,  $P>0.05$ )。

**与激素模型组比较:**

藻酸双酯钠组、阿仑磷酸钠组、联合用药组股骨头组织 caspase-3 阳性细胞率均明显降低( $t=2.97$ ,  $P<0.01$ ;  $t=2.462$ ,  $P<0.01$ ;  $t=1.854$ ,  $P<0.05$ )。

**与藻酸双酯钠组比较:**

阿仑磷酸钠组、联合用药组股骨头组织 caspase-3 阳性细胞率均明显降低( $t=1.691$ ,  $P<0.05$ ;  $t=1.959$ ,  $P<0.05$ )。

**与阿仑磷酸钠组比较:**

联合用药组股骨头组织 caspase-3 阳性细胞率无明显变化( $t=2.013$ ,  $P>0.05$ )。

### 3 讨论

国外学者发现应用激素使成骨细胞凋亡增加, 最终使骨细胞数量减少导致骨坏死<sup>[17]</sup>。近年来抑制骨细胞凋亡实验证实: 钙结合蛋白-D28k能通过抑制caspase-3的活性增加抑制骨细胞凋亡<sup>[18]</sup>。雌激素能通过抑制骨细胞凋亡抑制激素性骨病<sup>[19]</sup>。阿仑磷酸钠能够通过抑制骨细胞凋亡的途径抑制激素性骨质疏松<sup>[20]</sup>。二磷酸盐类一直是防治激素性骨质疏松最适合、安全的药物<sup>[21]</sup>, 目前阿仑磷酸钠已被批准治疗激素性股骨头坏死<sup>[22]</sup>。

实验通过检测大剂量应用激素后引起激素性股骨头坏死早期bcl-2、caspase-3的表达情况, 以进一步证实骨细胞凋亡为激素性股骨头坏死的发病机制, 并在应用激素的同时给予阿仑磷酸钠早期干预, 并检测其早期干预效应。从结果看, 采用强迫动物间断立位, 使成模率提高到90%, 成模时间缩短<sup>[23]</sup>。实验第4周激素模型组出现典型的股骨头坏死, 同时bcl-2表达较正常对照组明显减少, caspase-3表达明显增多; 联合用药组和正常对照组未发现股骨头坏死, 同时bcl-2、caspase-3的表达水平相近; 藻酸双酯钠组出现大部分股骨头坏死和bcl-2、caspase-3的表达显著异常; 阿仑磷酸钠组只有少部分存在脂肪细胞增多和造血细胞减少, 而骨小梁、成骨细胞数量和分布、破骨细胞数量与正常对照组比较无显著差异, bcl-2、caspase-3的表达与正常对照组基本相似。

实验结果提示, 骨细胞凋亡参与了激素性股骨头坏死的发病, bcl-2、caspase-3可能为骨细胞凋亡的机制; 联合用药可能通过抑制骨细胞凋亡途径预防激素性股骨头坏死的发生; 阿仑磷酸钠可能通过抑制bcl-2、caspase-3的表达来抑制骨细胞凋亡, 从而预防激素性股骨头坏死; 藻酸双酯钠虽然也有此作用, 但作用较弱。

总之, 激素性股骨头坏死发病机制并非单一, 即单用骨细胞凋亡学说并不能解释全部结果, 骨细胞凋亡只是激素性股骨头坏死的发病机制之一。bcl-2和caspase-3作为细胞凋亡发生和调控机制中两项重要组成成分, 二者之间以及在凋亡的调控中的相互关系非常复杂。

### 4 参考文献

- Kubo T, Fujioka M, Ishida M. Clinical condition of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. Clin Calcium 2007;17(6):856-862
- Li ZR, Sun W, Qu H, et al. Zhonghua Waike Zazhi 2005;8(43):1048-1053 李子荣, 孙伟, 屈辉, 等. 皮质类固醇与骨坏死关系的临床研究[J]. 中华外科杂志, 2005;8(43):1048-1053
- Yamamoto T, Miyanishi K, Motomura G, et al. Animal models for steroid-induced osteonecrosis. Clin Calcium 2007;17(6):879-886
- Okada Y, Nawata M, Nakayama S, et al. Alendronate Protects Premenopausal Women from Bone Loss and Fracture Associated with High-dose Glucocorticoid Therapy. J Rheumatol 2008; Epub ahead of print
- Tanaka Y. Prophylaxis of glucocorticoid-induced osteoporosis. Clin Calcium 2006;16(11):1858-1865
- Hu ZM, Wang HB, Zhou MQ, et al. Pathological changes of the blood vessels in rabbit femoral head with glucocorticoid-induced necrosis. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 2006;26(6):785-787
- Drescher W, Bunker MH, Weigert K, et al. Methylprednisolone enhances contraction of porcine femoral head epiphyseal arteries. Clin Orthop Relat Res 2004;423:112-117
- Cslder JD, Buttery L, Revell PA, et al. Apoptosis--a significant cause of bone cell death in osteonecrosis of the femoral head. J Bone Joint Surg Br 2004;86(8):1209-1213
- O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI, et al. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. Endocrinology 2004;145(4):1835-1841
- Tsuji M, Ikeda H, Ishizu A, et al. Altered expression of apoptosis-related genes in osteocytes exposed to high-dose steroid hormones and hypoxic stress. Pathobiology 2006;73(6):304-309
- Guruvayoorappan C, Pradeep CR, Kuttan G. 13-cis-Retinoic Acid Induces Apoptosis by Modulating Caspase-3, bcl-2, and p53 Gene Expression and Regulates the Activation of Transcription Factors in B16F-10 Melanoma cells. J Environ Pathol Toxicol Oncol 2008;27(3):197-207
- The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 2006-09-30[2008-08-06]. [http://www.most.gov.cn/zfwj/zfwj2006/200512/t20051214\\_54389.htm](http://www.most.gov.cn/zfwj/zfwj2006/200512/t20051214_54389.htm)
- 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见 [OL]. 2006-09-30. [2008-08-06]. [http://www.most.gov.cn/zfwj/zfwj2006/200512/t20051214\\_54389.htm](http://www.most.gov.cn/zfwj/zfwj2006/200512/t20051214_54389.htm)
- Bao SY, Bi LQ. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu 2007;11(10):1826-1829 暴淑英, 黎黎琦. 激素性股骨头坏死早期CRP水平变化和藻酸双酯钠干预后的骨重建效应[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(10):1826-1829
- Kitajima M, Shigematsu M, Ogawa K, et al. Effects of glucocorticoid on adipocyte size in human bone marrow. Med Mol Morphol 2007;40(3):150-156
- Conradie MM, de Wet H, Kotze DD, et al. Vanadate prevents glucocorticoid-induced apoptosis of osteoblasts in vitro and osteocytes in vivo. J Endocrinol 2007;195(2):229-240
- Eberhardt AW, Yeager Jones A, Blair HC. Regional trabecular bone matrix degeneration and osteocyte death in femora of glucocorticoid-treated rabbits. Endocrinology 2001;142(3):1333-1340
- Zalavras C, Shah S, Birnbaum MJ, et al. Role of apoptosis in glucocorticoid-induced osteoporosis and osteonecrosis. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 2003;13(2-4):221-235
- Liu Y, Porta A, Peng X, et al. Prevention of glucocorticoid-induced apoptosis in osteocytes and osteoblasts by calbindin-D28k. J Bone Miner Res 2004;19(3):479-490
- Gu G, Hentunen TA, Nars M, et al. Estrogen protects primary osteocytes against glucocorticoid-induced apoptosis. Apoptosis 2005;10(3):583-595
- Plotkin LI, Lezcano V, Thostenson J, et al. Connexin 43 is required for the anti-apoptotic effect of bisphosphonates on osteocytes and osteoblasts in vivo. J Bone Miner Res 2008;23(11):1712-1721
- Rossi CM, Di Comite G. Teriparatide or alendronate in glucocorticoid-induced osteoporosis. N Engl J Med 2008;358(12):1302
- Silverman SL, Maricic M. Recent developments in bisphosphonate therapy. Semin Arthritis Rheum 2007;37(1):1-12
- Boss JH, Misselevich I. Osteonecrosis of the femoral head of laboratory animals: the lessons learned from a comparative study of osteonecrosis in man and experimental animals. Vet Pathol 2003;40(4):345-354