

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.28.006

[http://www.crter.org]

张敬东, 易先宏, 李玉安. 缺血再灌流股骨头髌影响关节软骨细胞的凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(28):5133-5138.

缺血再灌流股骨头髌影响关节软骨细胞的凋亡☆

张敬东, 易先宏, 李玉安(温州医学院附二院骨科, 浙江省温州市 325027)

文章亮点:

1 实验通过缺血再灌注组以无损伤血管夹夹闭分叉处或稍上方夹闭腹主动脉, 建立幼年期髌关节缺血再灌注的实验模型, 产生缺血再灌注后未发育成熟关节软骨的早期退行性改变。

2 同时实验用 TUNEL 法检测股骨头髌关节软骨细胞凋亡现象以从中推测关节软骨的早期退行性改变是否与软骨细胞凋亡调节异常有一定关联。

3 在缺血-再灌流后 48 h, 股骨头髌关节软骨的浅层及中层可见集群的软骨细胞凋亡。考虑成年后的关节软骨与未发育成熟的关节软骨在细胞凋亡的调节机制上还是有相当大的差别。对于在关节软骨深层均未见到软骨细胞凋亡的现象, 推测可能是发育期深层的软骨细胞的抗凋亡机制较幼稚的软骨细胞更为成熟。

关键词:

组织构建; 软骨组织构建; 缺血再灌注; 股骨头髌; 髌关节; 关节软骨; 细胞凋亡; 软骨细胞; 动物模型

摘要

背景: 缺血再灌注后可以引起关节软骨的退行性变化, 但其中具体机制尚无共识。

目的: 观察发育期髌关节股骨头髌关节软骨及缺血再灌注后关节软骨的退行性变化及其细胞凋亡现象。

方法: 80 只 SD 大鼠随机分为 2 组, 缺血再灌注组建立髌关节缺血再灌注实验动物模型, 假手术组开腹暴露腹主动脉 5 min 常规关腹。于模型建立后 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 5 d, 2 周, 4 周不同时点对股骨头髌关节软骨进行光镜病理形态学观察, 同时对标本进行 TUNEL 法检测股骨头髌关节软骨细胞凋亡现象。

结果与结论: 缺血再灌注组术后光镜观察到软骨细胞变性、减少、基质可见局限性纤维化等关节软骨退行性变化, 两组 TUNEL 法检测均观察到关节软骨细胞的凋亡现象, 假手术组偶见有散在分布 5 个以下的软骨细胞凋亡, 缺血再灌注组观察到 48 h 可见 10-30 个软骨细胞发生凋亡。结果提示, 缺血再灌注对髌关节股骨头髌关节软骨可引起退行性改变, 发育期髌关节缺血再灌注后关节软骨的细胞凋亡可能参与关节软骨的损害, 抑制关节软骨的细胞凋亡可能有助于防治早发的骨关节炎。

Does ischemia/reperfusion impact apoptosis of articular chondrocyte in the femoral head epiphyses

Zhang Jing-dong, Yi Xian-hong, Li Yu-an (Department of Orthopaedic Surgery, Second Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Ischemia/reperfusion can induce degenerative alterations in articular cartilage. However, the precise mechanism remains poorly understood.

OBJECTIVE: To observe the morphological changes and the apoptosis of articular cartilage of femoral head epiphyses with ischemia/reperfusion.

METHODS: A total of 80 Sprague-Dawley rats were randomly assigned to two groups: ischemia/reperfusion (model of ischemia/reperfusion in hip joint) and sham-surgery (exposure of abdominal aorta for 5 minutes) groups, with 40 animals in each group. Articular cartilages of femoral head epiphysis were collected in 6, 12, 24, and 48 hours, 5 days, and 2 and 4 weeks after operation. Morphology of articular cartilage of femoral head epiphyses was examined by light microscope, and cell apoptosis was detected by TUNEL method.

RESULTS AND CONCLUSION: Light microscopy showed chondrocytes degeneration and reduction, as well as fibrosis in matrix of cartilage in the ischemia/reperfusion group. Chondrocyte apoptosis was observed in both groups by TUNEL. Several apoptotic cells, less than five, were observed in the sham-surgery, while 10-30 apoptotic cells were found in ischemia/reperfusion group at 48 hours. Results indicated that ischemia/reperfusion can induce degenerative changes in articular cartilage of femoral head epiphyses, and cell apoptosis in developing hip joint may participate in damage of articular cartilage. Inhibition of chondrocyte apoptosis in articular cartilage may be useful for the prevention and cure of early osteoarthritis.

Key Words: tissue construction; cartilage tissue construction; ischemia/reperfusion; femoral head epiphyses; hip joint; articular cartilage; apoptosis; chondrocyte; animal model

张敬东☆, 男, 1969 年生, 重庆市人, 土家族, 2002 年四川大学毕业, 博士, 副教授, 主要从事儿童骨科基础与临床研究。
Zhangjingdong920@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)28-05133-06

收稿日期: 2012-11-29
修回日期: 2013-01-14
(20120229009/W-A)

Zhang Jing-dong☆, M.D., Associate professor, Department of Orthopaedic Surgery, Second Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China
Zhangjingdong920@yahoo.com.cn

Received: 2012-11-29
Accepted: 2013-01-14

Zhang JD, Yi XH, Li YA. Does ischemia/reperfusion impact apoptosis of articular chondrocyte in the femoral head epiphyses. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(28):5133-5138.

0 引言

细胞凋亡是有机体在自身基因控制下的细胞有序死亡的方式,它在胚胎发育、免疫耐受、肿瘤发生、炎症转归及正常组织更新等生理、病理过程中起到重要的调节作用。已有发现骨关节炎的发生与软骨细胞凋亡调节机制异常关系密切^[1-4]。而缺血再灌注损伤可以引起退行性的骨关节炎,其中具体机制尚未完全了解,软骨细胞凋亡调节机制可能参与^[5]。

小儿的骨关节疾病,常有后遗早发骨关节炎,在小儿常见的髋关节疾病的病理过程或治疗中与关节内压增高或骨内压增高造成供血或静脉回流障碍有关,由于关节软骨本身有潜在产生氧自由基的能力,其最终的关节软骨损害与缺血再灌注损伤有一定关系。实验建立髋关节缺血再灌注的实验模型,产生缺血再灌注后未发育成熟的关节软骨早期退行性改变。同时实验用TUNEL法检测股骨头髌关节软骨细胞凋亡现象以从中推测关节软骨的早期退行性改变是否与软骨细胞凋亡调节异常有一定关联。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2005年10月至2007年12月在温州医学院动物实验中心完成。

材料:

实验动物: 4周龄雄性SD大鼠80只,体质量(75±10)g。实验动物由温州医学院动物实验中心提供。80只SD大鼠随机分为缺血再灌注组和假手术组,每组各40只。

缺血再灌注股骨头髌对关节软骨细胞凋亡的影响实验用主要试剂:

试剂	来源
原位细胞凋亡检测试剂盒	德国 Boehringer Mannheim 公司
蛋白酶 K、碱磷酸底物 BCIP/NBT 显色浓缩液	北京中山生物技术有限公司

方法:

髋关节缺血再灌注实验动物模型建立: 缺血再灌注组以无损伤血管夹夹闭分叉处或稍上方夹闭腹主动脉3 h:以体积分数5%水合氯醛6 mL/kg腹腔内注射麻醉,大鼠平卧位固定,常规消毒铺巾,取下腹部正中直切口入腹,推移肠管、睾丸,注意保护膀胱,切开后腹膜,暴露双

侧髂总动脉分叉处腹主动脉,缺血-再灌注组以无损伤血管夹夹闭分叉处或稍上方夹闭腹主动脉,腹腔内注入生理盐水1.0-2.0 mL,达成预定时间后拆除血管夹,关闭切口,建立髋关节缺血再灌注动物模型。手术后自由饮水,标准饲料喂养。假手术组开腹暴露腹主动脉5 min常规关腹。

标本采集: 缺血再灌注及假手术组分别于术后3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 5 d, 2周、4周活取右侧股骨头髌,于股骨头凹外侧缘顺股骨头髌纵轴切开,以体积分数4%甲醛固定。

苏木精-伊红染色: 标本的固定经乙醇梯度脱水(体积分数70%-100%),二甲苯浸泡后放入包埋器,于56℃石蜡液中浸蜡完成组织包埋;蜡块固定于切片机上作厚4 μm的组织切片(顺股骨头髌纵轴切片以确保关节软骨全厚层切片)置于载玻片,切片干燥后染色;脱蜡和下行乙醇到水后行苏木精染色5 min,1%盐酸乙醇分色和稀氨水蓝化后行伊红染色5 min,再经上行乙醇脱水、透明后树脂封固。切片置光镜下,对关节软骨表面、浅层、中层、深层及软骨下连接部进行观察。

TUNEL法检测关节软骨细胞凋亡:

组织固定与包埋: 体积分数4%中性甲醛固定标本,常规石蜡包埋。

实验步骤: ①作4 μm厚石蜡切片(注意顺股骨头髌纵轴切片以确保关节软骨全厚层切片),贴于经APES处理的载玻片,置58℃烤箱60 min,使切片紧密黏附。②常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,微干。PBS冲洗,5 min×3次。③滴加蛋白酶K(10 mg/L),37℃消化30 min。④蒸馏水洗,PBS冲洗,3 min×3次,擦干组织周围水分。⑤滴加体积分数3% H₂O₂,室温10 min以阻断内源性过氧化物酶活性。PBS冲洗,5 min×3次。⑥滴加TUNEL反应混合液(20 μL/片),37℃孵育1 h。PBS冲洗,5 min×3次。TUNEL反应混合液的配制:1液为脱氧核苷酸转移酶液和带荧光标记的混合核苷酸液,FITC标记的dUTP,enzyme液、Label液,2液为标准缓冲液,1液:2液=1:10。⑦滴加抗FITC-AP(即用型,20-30 μL/片),37℃孵育30 min。PBS冲洗,5 min×3次。⑧BCIP/NBT(工作液浓度为1:100)显色,显色时需加盖,随时观察,蒸馏水洗。将BCIP/NBT和Buffer III按1:100比例配制工作液,Buffer III配方:pH 9.5的100 mmol/L Trisel,100 mmol/L NaCl,50 mmol/L MgCl₂。⑨苏木精轻度复染,梯度乙醇脱水。⑩二甲苯透明,中性树脂封固。

对照设计: 用坏死性淋巴结炎组织切片作阳性对照,仅加Label液不加enzyme液作为阴性对照,其余步

骤相同。

结果判断：细胞核呈紫蓝色为TUNEL阳性细胞。

光镜观察：切片置光镜下，先于低倍镜下对整个视野进行观察，如发现凋亡阳性信号则转至高倍镜下确认，对股骨头髌关节软骨各层的软骨细胞凋亡现象进行观察。

主要观察指标：①关节软骨苏木精-伊红染色观察结果。②TUNEL法检测关节软骨细胞凋亡结果。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验选用SD大鼠80只，分为2组，无脱失，全部进入结果分析。

2.2 光镜观察关节软骨组织形态学变化

软骨细胞的观察：24 h前软骨细胞无明显变化，24 h、48 h、5 d可见部分软骨细胞轻度肿胀，软骨细胞核膜模糊、核溶解，有核空泡化现象，提示少量软骨细胞变性，5 d、2周、4周可见局灶性软骨细胞减少，但未见明显软骨细胞坏死，深层软骨细胞排列不规则，部分软骨细胞有胞浆空泡化表现，局限性软骨细胞减少、消失，软骨陷窝未见软骨细胞，软骨细胞层次分界不清，4周偶见深层软骨细胞内钙化，深层柱状排列的软骨细胞数目明显减少，甚至仅残存1-3列，4周深层软骨细胞完全失去柱状排列，软骨细胞稀少。

软骨基质的改变：光镜下48 h、5 d、2周、4周时点可观察到关节软骨浅层、中层基质局限性嗜酸性增强的红染表现，2周、4周时点深层软骨基质可有明显的嗜碱性，甚至可有嗜碱性染色增强，提示局部钙盐沉积即将钙化，但也有失去嗜碱性异染性，提示软骨基质中硫酸软骨素明显减少。软骨中各层有局灶性基质肿胀，部分切片可见胶原裸露，关节软骨各层基质可见局限性纤维化表现。

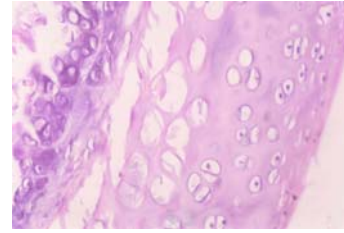
关节软骨表面软骨下连接部的观察：4周可见关节软骨表面粗糙，表面有多条裂纹，裂纹处小梭形软骨细胞可有局限性增生。部分5 d、2周、4周软骨深层下方无成骨细胞、骨小梁样结构等骨样组织相连。见图1。

2.3 TUNEL法检测关节软骨细胞凋亡现象

假手术组的观察：假手术组12 h、24 h、48 h、5 d、2周、4周各时点均未见集群的软骨细胞凋亡，但可偶见有散在分布5个以下的软骨细胞凋亡(48 h 1只，5 d时1只，2周时1只)，一般位于头髌关节软骨的浅层或中层。而在各切片的头髌关节软骨深层均未见到明显的细胞凋亡信号。

缺血-再灌注组的观察：缺血-再灌注组48 h可见10-30个软骨细胞发生凋亡(2只)，位于头髌关节软骨的浅层及中层，聚集存在。在其他各时点关节软骨的浅层或中层也偶见个别散在分布的软骨细胞凋亡(24 h 1只，5 d时1

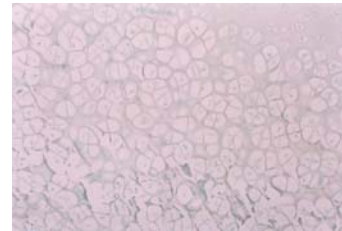
只，2周时1只)，但同样均未见5个以上的软骨细胞凋亡现象。同时也同样在各时点的头髌关节软骨深层肥大细胞也未见明显的阳性凋亡细胞。见图2-4。



注：缺血再灌注组建立髌关节缺血再灌注实验动物模型；图片可见深层软骨细胞完全失去柱状排列，软骨细胞稀少，可见深层软骨基质有嗜碱性增强，软骨有局灶性基质肿胀，关节软骨表面粗糙，表面有裂纹，裂纹处小梭形软骨细胞有局限性增生。

图1 缺血再灌注组4周时关节软骨观察结果(苏木精-伊红染色, ×400)

Figure 1 Articular cartilage after ischemia/reperfusion for 4 wk (hematoxylin-eosin staining, ×400)



注：假手术组开腹暴露腹主动脉5 min 常规关腹；图片显示关节软骨的浅层及中层未见凋亡信号阳性软骨细胞。

图2 假手术组48 h用TUNEL法检测凋亡(BCIP/NBT, ×100)

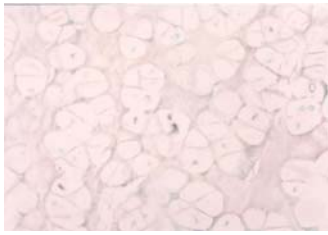
Figure 2 Apoptosis in sham-surgery group at 48 h as detected by TUNEL method (BCIP/NBT, ×100)



注：缺血再灌注组建立髌关节缺血再灌注实验动物模型；48 h可见关节软骨的浅层及中层集群存在的10-30个凋亡信号阳性软骨细胞。

图3 缺血再灌注组48 h用TUNEL法检测凋亡(BCIP/NBT, ×100)

Figure 3 Apoptosis in ischemia/reperfusion group at 48 h detected by TUNEL method (BCIP/NBT, ×100)



注: 缺血再灌注组建立髌关节缺血再灌注实验动物模型; 可偶见散在分布的凋亡信号阳性软骨细胞。

图4 缺血再灌注组 5 d 时点凋亡检测(BCIP/NBT, ×100)

Figure 4 Apoptosis in ischemia/reperfusion group at 5 d (BCIP/NBT, ×100)

标本软骨细胞凋亡检出情况表: 见表1。

表1 TUNEL法检测假手术组和缺血再灌注组软骨细胞凋亡检出率情况(阳性数/标本数)

Table 1 Apoptosis rate in sham-surgery and ischemia/reperfusion groups as detected by TUNEL method (positive samples/number of samples)

分组	12 h	24 h	48 h	5 d	2周	4周
假手术组	0/3	0/3	1/3 ^a	1/3 ^a	1/3 ^a	0/3
缺血再灌注组	0/3	1/3 ^a	2/3 ^b	1/3 ^a	1/3 ^a	0/3

注: 缺血再灌注组建立髌关节缺血再灌注实验动物模型, 假手术组开腹暴露腹主动脉 5 min 常规关腹; ^a表示见 5 个以下的阳性凋亡细胞, ^b表示见 10 个以上的阳性凋亡细胞; 缺血-再灌注组 48 h 可见 10 个以上软骨细胞发生凋亡

3 讨论

缺血缺氧再灌注损伤与许多疾病和损伤的发生有密切的联系, 严重的骨与软组织损伤、断肢再植、骨筋膜室综合征、过长时间使用止血带后与再灌注损伤有关。在肢体缺血再灌注方面的研究, 目前国内外已有许多作者对此进行了实验与临床的研究^[6-8]。通过这些研究, 一般认为, 肢体在一个半小时以内的缺血再灌注, 通过机体自身氧自由基清除剂的作用可以维持机体的平衡, 不至于造成组织器官的损害。并且通过β-七叶皂代武钠、川芎嗪等药物的作用可在一定程度上缓解缺血再灌注的损害作用。

在膝关节的类风湿关节炎、骨性关节炎的病例研究中^[9-12], 由于运动造成关节内的压力高于滑膜组织灌注压时, 可致关节内缺血缺氧, 静息状态时血氧再灌注可

致关节内氧自由基增高, 因此首先提出氧自由基损害可能参与关节炎的病理过程。1996年, Ito等^[13]在脂质过氧化对成骨细胞及血管内皮细胞作用的研究中, 推测缺血再灌注损伤机制可能在股骨头缺血性坏死的发生发展中具有一定作用。1998年, Schneider等^[14]报道以放射微球技术, 通过关节内压与股骨头髌血供关系的研究可以制作股骨头髌的缺血再灌注模型, 但并未对其影响和机制深入探讨。其后, 通过该方法的报导认为股骨头髌在缺血6 h后再灌注能力与缺血前并无差异。最近国内也有关于缺血再灌注对膝关节软骨影响的研究, 组织形态学观察到缺血2 h后再灌注有关节软骨的退行性改变, 认为再灌注损伤中氧自由基损害可能引起关节软骨的退行性改变。

关节软骨的退行性变化首先出现于软骨基质, 光镜下软骨细胞的改变往往不明显。软骨基质出现嗜酸性变, 可能由于软骨素硫酸含量减少所致, 当基质中粘多糖含量减少时, 基质中原有胶性结构发生变化, 埋藏的胶原纤维时可显露, 可有纤维化表现。当退行性改变到一定程度时, 可有软骨细胞局灶性减少, 也可有局灶性软骨基质肿胀, 关节软骨表面基质粗糙、并具裂纹。软骨细胞可出现胞浆空泡样变。

在实验过程中, 通过苏木精-伊红染色的切片可以观察到关节软骨一定程度的退行性改变, 后期较为明显, 主要表现为一种早期的退行性演变过程。因此从侧面可以进一步论证缺血再灌注可引起关节软骨的退行性改变。

实验重点在于缺血再灌注对股骨头髌软骨退行性变化影响中观察股骨头髌关节软骨细胞凋亡现象, 以从中推测关节软骨的早期退行性改变是否与软骨细胞凋亡调节异常有一定关联。

TUNEL法, 即末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记法 (terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP nick end labeling), 利用末端脱氧核苷酸转移酶在DNA片段3'末端连接带有标记的核苷酸, 是检测细胞凋亡的理想方法之一, 具有敏感性高、特异性强、快速方便、简单易行等优点, 已有很多的研究应用TUNEL法进行凋亡的检测。

多种因素可启动细胞内部基因, 调控细胞凋亡。在器官移植研究领域中均会遇到缺血-再灌注损伤的问题, 器官组织再灌注时释放的反应性氧自由基可引起包括脂质过氧化损伤、多形核白细胞浸润、MHC抗原及黏附分子表达增加^[15], 从而诱导细胞凋亡。Schumer等^[16-17]在钳夹大鼠肾动脉引起短暂完全肾缺血的实验研究中发现, 再灌注后可启动肾小管细胞凋亡, 最早见于再灌注后12 h, 至24 h细胞凋亡数量明显增加, 说明肾小管细胞凋亡是热缺血及随后的再灌注所致。目前已有大量的研究, 提示细胞凋亡是缺血-再灌注损伤的普遍现

象^[18-22]。

实验研究发现, 在缺血-再灌注后48 h存在一定程度的股骨头髌关节软骨细胞凋亡现象, 凋亡细胞集群存在, 表现为明确的细胞核紫蓝色凋亡信号, 说明关节缺血-再灌注后关节软骨细胞也可以存在凋亡, 但在其他各时点均未见到多个细胞凋亡的现象, 作者推测可能由于股骨头髌本身对缺血的耐受性较强, 同时缺血3h后再灌注后的损伤也许并不引起持续大量的软骨细胞发生凋亡。

在滑膜关节, 关节软骨在自身发育过程中, 终末分化软骨细胞快速、稳定的去除的生理机制即是通过凋亡的方式^[23-26], 如果没有合适的方式去除关节软骨中的终末分化细胞, 生长板厚度持续增加, 将导致骨形成受到抑制。而关节软骨细胞发生凋亡的原因, 研究认为肥大软骨细胞表型X型胶原的表达是引起软骨细胞发生凋亡的原因^[1,27]。病理情况下关节软骨细胞尽管可有增殖, 但增殖的软骨细胞分化为肥大软骨细胞, 失去II型胶原表型, 合成大量的X型胶原, 这种现象可见于骨关节炎关节软骨的全层, 进而导致软骨基质的损害及表面结构的不完整。由于X型胶原不能象II、IX、XI型胶原一样形成纤维网架结构, 这样就削弱了软骨基质的力量而可能为钙化做准备, 关节软骨因此发生退行性改变。

斐明等^[1]在对骨关节炎关节软骨的X型胶原及凋亡的原位杂交及原位末端标记的研究中发现, 骨关节炎的簇集软骨细胞群表达X型胶原同时存在凋亡, 认为软骨细胞凋亡可能在骨关节炎的发病机制中起重要作用, 与骨关节炎预后关系密切。他们在骨关节炎关节软骨的深层检测到X型胶原基因表达, 而有人则在上层纤维化区用免疫组化的方法检测到X型胶原蛋白的存在^[27-30], 并无mRNA的表达, 这种不一致现象可能因为X型胶原半衰期较长, 而mRNA半衰期较短。

实验研究发现, 在缺血-再灌注后48 h, 股骨头髌关节软骨的浅层及中层可见集群的软骨细胞凋亡, 而在其他各时点均未见到这一现象, 但在缺血再灌注组及假手术组可偶见散在的个别软骨细胞凋亡。而斐明等^[1]在作为对照的6个正常成年人关节软骨中并未见到细胞凋亡现象。作者推测这方面的不一致可能有两方面的原因: 一方面由于凋亡数量较少且半衰期较短, 仅在数个或数十个标本的检测中不易得出较为全面的结论, 另一方面, 成年后的关节软骨与未发育成熟的关节软骨在细胞凋亡的调节机制上还是有相当大的差别^[27]。对于在关节软骨深层均未见到软骨细胞凋亡的现象, 作者推测可能是发育期深层的软骨细胞的抗凋亡机制较幼稚的软骨细胞更为成熟。

作者贡献: 第一作者进行设计及评估, 第一、二、三作者共同进行实验实施。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 缺血再灌注损伤-缺血所引的组织损伤是致死性疾病的主要原因, 诸如冠状动脉硬化导致的心肌梗死、脑卒中等。在缺血性疾病抢救和治疗过程中, 医学家们渐渐发现, 对组织造成损伤的主要因素, 不是缺血本身, 而是恢复血液供应后, 过量的自由基攻击这部分重新获得血液供应的组织内的细胞造成的, 这种损伤, 叫做“组织缺血再灌注损伤”。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] 斐明, 曲绵绒, 于长隆, 等. 凋亡在骨关节炎发病机制中的作用[J]. 中华骨科杂志, 1999, 19:167-169.
- [2] Zheng X, Xia C, Chen Z, et al. Requirement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway for the effect of nicotine on interleukin-1 β -induced chondrocyte apoptosis in a rat model of osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 423(3):606-612.
- [3] Ou Y, Tan C, An H, et al. Selective COX-2 inhibitor ameliorates osteoarthritis by repressing apoptosis of chondrocyte. *Med Sci Monit.* 2012; 18(6):BR247-52.
- [4] Kim KM, Kim JM, Yoo YH, et al. Cilostazol induces cellular senescence and confers resistance to etoposide-induced apoptosis in articular chondrocytes. *Int J Mol Med.* 2012; 29(4):619-624.
- [5] Okuma C, Kaketa T, Hikita A, et al. Potential involvement of p53 in ischemia/reperfusion-induced osteonecrosis. *J Bone Miner Metab.* 2008; 26(6):576-585.
- [6] 蓝旭, 刘雪梅, 葛宝丰, 等. β -七叶皂甙钠对肢体缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国矫形外科杂志, 2000, 9(6):572-573.
- [7] Karahalil B, Polat S, Senkoylu A, et al. Evaluation of DNA damage after tourniquet-induced ischaemia/reperfusion injury during lower extremity surgery. *Injury.* 2010; 41(7): 758-762.
- [8] 庄洪. 川芎嗪对肢体缺血再灌注损伤的临床实验研究[J]. 中国骨伤, 2001, 14(6):343-344.
- [9] Blake DR, Merry P, Unsworth J, et al. Hypoxic-reperfusion injury in the inflamed human joint. *Lancet.* 1989; 332(8633): 289-292.
- [10] Soran N, Altindag O, Cakir H, et al. Assessment of paraoxonase activities in patients with knee osteoarthritis. *Redox Rep.* 2008; 13(5):194-198.
- [11] Mrowicka M, Garncarek P, Bortnik K, et al. Activity of superoxide dismutase (CuZn-SOD) in erythrocytes of patients after hips alloplasty. *Pol Merkur Lekarski.* 2008; 24(143): 396-398.
- [12] Altindag O, Erel O, Aksoy N, et al. Increased oxidative stress and its relation with collagen metabolism in knee osteoarthritis. *Rheumatol Int.* 2007; 27(4):339-344.

- [13] Iio H, Ake Y, Saegusa Y, et al. The effect of lipid peroxide on osteoblasts and vascular endothelial cells: the possible role of ischemia-reperfusion in the progression of avascular necrosis of the femoral head. *Kobe J Med Sci.* 1996;42: 361-373.
- [14] Schneider T, Drescher W, Becker C, et al. Reperfusion capacity of the femur head after ischemia: an experimental study. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 1998;136: 132-137.
- [15] 张敬东, 陈华, 温宏. 诱导型一氧化氮合成酶在股骨头骨关节软骨缺血-再灌注后的表达[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(10):1830-1832.
- [16] Schumer M, Colombel MC, Sawczuk JS, et al. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of renal ischemia. *Am J Pathol.* 1992; 140: 831-838.
- [17] Lobb I, Mok A, Lan Z, et al. Supplemental hydrogen sulphide protects transplant kidney function and prolongs recipient survival after prolonged cold ischaemia-reperfusion injury by mitigating renal graft apoptosis and inflammation. *BJU Int.* 2012; 110(11):E1187-95.
- [18] Krams SM, Egawa H, Quinn MB, et al. Apoptosis as a mechanism of cell death in liver allograft rejection. *Transplantation.* 1995; 59: 621-625.
- [19] 齐丽彤, 张钧华, 李大元, 等. 血管紧张素 I II 型受体阻断剂抑制大鼠缺血-再灌注模型心肌细胞凋亡[J]. *中华心血管病杂志*, 2001, 29(2):118-121.
- [20] Burns AT, Davies DR, McLaren AJ, et al. Apoptosis in ischemia/reperfusion injury of human renal allografts. *Transplantation.* 1998;66: 872-876.
- [21] Qi Y, Chen L, Zhang L, et al. Crocin prevents retinal ischaemia/reperfusion injury-induced apoptosis in retinal ganglion cells through the PI3K/AKT signalling pathway. *Exp Eye Res.* 2012; 107C:44-51.
- [22] Liu DH, Yuan FG, Hu SQ, et al. Endogenous nitric oxide induces activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 via S-nitrosylation in rat hippocampus during cerebral ischemia-reperfusion. *Neuroscience.* 2013; 229:36-48.
- [23] Gibson G, Lin DL, Roque M. Apoptosis of terminally differentiated chondrocyte in culture. *Exp Cell Res.* 1997;233: 372-382.
- [24] Hatori M, Klatte KJ, Teixeira CC, et al. End labeling studies on fragmented DNA in the avian growth plate: evidence of apoptosis in terminally differentiated chondrocytes. *J Bone Miner Res.* 1995;10: 1960-1968.
- [25] Zhao Z, Ji H, Jing R, et al. Extracorporeal shock-wave therapy reduces progression of knee osteoarthritis in rabbits by reducing nitric oxide level and chondrocyte apoptosis. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2012;132(11):1547-1553.
- [26] Lee HG, Yang JH. PCB126 induces apoptosis of chondrocytes via ROS-dependent pathways. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012;20(10):1179-1185.
- [27] Pokharna HK, Monnier V, Boja B, et al. Lysyl oxide Maillard reaction-mediated crosslinks in aging and osteoarthritic rabbit cartilage. *J Orthop Res.* 1995;13: 13-21.
- [28] Von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, et al. Type X collagen synthesis in human osteoarthritis cartilage: indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum.* 1992;35: 806-811.
- [29] Grskovic I, Kutsch A, Frie C, et al. Depletion of annexin A5, annexin A6, and collagen X causes no gross changes in matrix vesicle-mediated mineralization, but lack of collagen X affects hematopoiesis and the Th1/Th2 response. *J Bone Miner Res.* 2012; 27(11):2399-2412.
- [30] Tian Y, Peng Z, Gorton D, et al. Immunohistochemical analysis of structural changes in collagen for the assessment of osteoarthritis. *Proc Inst Mech Eng H.* 2011; 225(7):680-687.