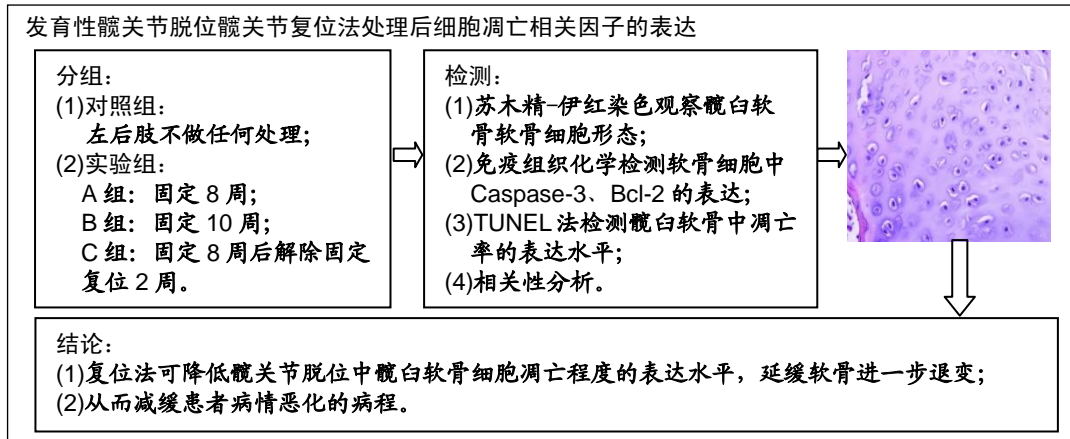


# 复位法矫正发育性髋脱位模型兔：髋臼软骨细胞Caspase-3、Bcl-2的表达水平

熊飞<sup>1</sup>, 韦宜山<sup>2</sup>(<sup>1</sup>江西省儿童医院, 江西省南昌市 330006; <sup>2</sup>内蒙古医科大学第二附属医院, 内蒙古自治区呼和浩特市 010030)  
DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0822 ORCID: 0000-0002-5420-5357(熊飞)

文章快速阅读:



熊飞, 男, 1992年生, 江西省南昌市人, 汉族, 2018年内蒙古医科大学毕业, 硕士, 主要从事发育性髋关节脱位发病机制的研究。

通讯作者: 韦宜山, 博士, 主任医师, 内蒙古医科大学第二附属医院, 内蒙古自治区呼和浩特市 010030

文献标识码: B

稿件接受: 2018-12-07



## 文题释义:

**发育性髋关节脱位:** 又称发育性髋关节发育不良及髋发育不全, 是较常见的先天性畸形, 股骨头在关节囊内丧失其与髋臼的正常关系, 以致在出生前及出生后不能正常发育。Hipkocsates 早在公元前就描述了该病, 之后众多学者对其进行了大量研究, 但发育性髋关节脱位的早期诊断和治疗至今仍然是一个尚未完全解决的课题。

**Caspase-3:** 是一种蛋白酶, 1994年 Fernandez-Alnemri 等在 BenBank 表达序列标记(expression sequence tag, EST)数据库中找到一段与 ICE/CED-3 活性中心同源的序列, 用它合成探针后, 筛选人 Jurkat T 淋巴细胞 cDNA 文库, 从中克隆到一种新基因, 因其编码分子质量为 32 ku 的半胱氨酸蛋白酶而称之为 CPP32 (cysteine protease protein)。随后, 其他学者独立地将这一蛋白基因克隆出来, 并分别命名为 prICE、apopain (凋亡素)和 Yama(印度传说中的死亡之神)。1996年这种蛋白酶被命名为 caspase-3。现在一般认为 caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, 也是 CTL 细胞杀伤机制的重要组成部分。

## 摘要

**背景:** 关节软骨细胞凋亡的异常表达会引起软骨退变, 最终发展为骨性关节炎。

**目的:** 观察发育性髋关节脱位模型经过髋关节复位法处理后细胞凋亡相关因子的表达情况。

**方法:** 随机选取 28 日龄的新西兰大白兔 60 只, 雌雄不限, 在兔右后肢屈髋伸膝位时用管型石膏固定 8 周制作髋关节脱位动物模型, 固定的右后肢作为实验组, 同只兔的左后肢不做任何处理作为对照组。8 周后根据 X 射线片、髋臼指数、股骨头脱位程度判断造模情况。选取造模成功的 48 只兔, 根据兔右后肢不同的处理方式, 将实验组再分为 A 组(固定 8 周)、B 组(固定 10 周)、C 组(固定 8 周后解除固定复位 2 周), 每组 16 只。实验结束后苏木精-伊红染色观察髋臼软骨软骨细胞形态; 免疫组织化学法检测软骨细胞中 Caspase-3、Bcl-2 的表达; TUNEL 法检测髋臼软骨中凋亡率的表达水平; 并进行相关性分析。

**结果与结论:** ①A、B、C 实验组髋臼指数均较其对照组明显增大( $P < 0.05$ ); ②苏木精-伊红染色后对照组软骨细胞形态规整, A、B 实验组出现空泡细胞, 部分结构消失, C 实验组髋臼和股骨头关节软骨细胞结构较完整, 空泡现象较少; ③TUNEL 结果示 C 实验组的凋亡率低于 B 实验组, 但高于其对照组( $P < 0.05$ ), 说明经过复位法处理后凋亡率有所降低; ④相关性分析示实验组细胞凋亡率与 Caspase-3 表达水平呈正相关, 与 Bcl-2 表达水平呈负相关; ⑤结果说明, 复位组较固定 8 周、固定 10 周 Bcl-2 高表达, 凋亡率较固定 10 周低表达, 说明复位处理后软骨细胞凋亡速度放缓, 同时凋亡效应蛋白 Caspase-3 较固定 10 周低表达, 凋亡程度有所降低。复位法可降低髋关节脱位中髋臼软骨细胞凋亡程度的表达水平, 延缓软骨进一步退变的进程, 从而减缓患者的病情恶化的病程。

## 关键词:

组织构建; 髋关节脱位; 复位; 软骨; 细胞凋亡; Bcl-2; Caspase-3; 发育性髋关节发育不良; 髋发育不全  
中图分类号: R459.9; R684; R318

Xiong Fei, Master, Jiangxi Provincial Children's Hospital, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Corresponding author: Wei Yishan, MD, Chief physician, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China

## Reduction for developmental dysplasia of the hip in rabbits: expression levels of Caspase-3 and Bcl-2 in acetabular chondrocytes

Xiong Fei<sup>1</sup>, Wei Yishan<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Jiangxi Provincial Children's Hospital, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China; <sup>2</sup>the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Abnormal increase in the number of apoptotic articular chondrocytes can induce cartilage degeneration, further deteriorate and develop into osteoarthritis.

**OBJECTIVE:** To observe the expression of apoptosis-related factors in the treatment of developmental dysplasia of the hip by reduction.

**METHODS:** Sixty 28-day-old New Zealand white rabbits (either sex) were randomly selected, then the right hind limbs were fixed with tubular gypsum in flexion of hip and extension of knee for 8 weeks to establish an animal model of developmental dysplasia of the hip, and the left hind limbs served as controls. Subsequently, the successful models were judged by the X-ray film, acetabular index, and dislocation of the femoral. Forty-eight model rabbits were equally randomized into group A (8 weeks of fixation), group B (10 weeks of fixation), group C (embolism at 2 weeks after 8 weeks of fixation). The morphology of chondrocytes at the acetabular cartilage was observed after hematoxylin-eosin staining. The expression levels of Caspase-3 and Bcl-2 in chondrocytes were detected by immunohistochemistry. The apoptosis rate in the acetabular cartilage was detected by TUNEL method, and the correlation was analyzed.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) The acetabular index in the groups A, B and C was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). (2) The morphology of chondrocytes in control group after hematoxylin-eosin staining was regular, and the groups A and B appeared with vacuolate cells, part of the structure disappeared, and the structures of acetabular and femoral head articular cartilage were complete, with less vacuole in the group C. (3) TUNEL method found that the apoptosis rate in the group C was lower than that in the group B, but higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ), indicating the decreased apoptotic rate after reduction. (4) Correlation analysis showed that the apoptosis rate was positively correlated with the expression level of Caspase-3 and negatively correlated with Bcl-2 expression. (5) To conclude, the reduction group shows a highly expressed Bcl-2, decreased expression of Caspase-3 and reduced apoptosis rate. Therefore, the reduction method can reduce the apoptosis rate of acetabular chondrocytes in developmental dysplasia of the hip, delay the degeneration of cartilage, and slow the course of disease progression.

**Key words:** tissue construction; hip dislocation; reduction; cartilage; cell apoptosis; Bcl-2; Caspase-3; developmental dysplasia of the hip; hip dysplasia

## 0 引言 Introduction

发育性髋关节脱位是并不少见的发育性疾病, 病因仍未明确, 基因遗传因素、机械过载、髋臼软骨损伤、髋臼发育不良、内分泌因素、微循环改变等都可导致该脱位。发育性髋关节脱位患者出生时存在, 常见于后方脱位, 如不进行早期治疗, 会进行性加重, 大部分患者能得到早期诊断、治疗; 而另一部分患者在幼儿期时可没有临床体征, 早期未治疗随时间进展形成不同程度的骨性关节炎, 给后期治疗带来困难, 降低了生活质量, 并给患者家庭及社会带来了巨大的心理和经济负担<sup>[1]</sup>。

髋关节软骨细胞的凋亡过程是一个多因素事件复杂作用的结果, 关节软骨细胞凋亡的异常表达会引起软骨退变, 最终发展为骨性关节炎<sup>[2-4]</sup>。目前, 细胞凋亡主要有3条通路, 其中线粒体通路是由Bcl-2家族成员接受死亡信号后激活, 被释放的细胞色素C(Cytc), 启动Caspase级联反应, 细胞凋亡<sup>[5-8]</sup>。Caspase-3作为凋亡效应因子, 其活性形式异常增加, “细胞凋亡程序”将难以逆转<sup>[5-9]</sup>。实验分析了发育性髋关节脱位模型经过髋关节复位法处理后细胞凋亡相关因子的表达情况, 为外科治疗发育性髋关节脱位提供更好的切入点。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年4月至2017年6月在内蒙古医科大学基础医学院免疫与微生物实验室完成。

1.3 材料

**实验动物:** 随机选择清洁级健康28日龄的新西兰大白

兔60只, 体质量(0.50±0.05) kg, 雌雄无限制, 实验动物全部于内蒙古农业大学动物实验中心购买。

**实验用主要试剂:** Caspase-3抗体、Bcl-2抗体、TUNEL检测试剂盒均为(武汉博士德生物工程有限公司); 免疫组织化学试剂盒、DAB显色试剂盒(均为北京中美迈新生物医药技术有限公司)、40 g/L多聚甲醛、3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APES)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 发育性髋关节脱位动物模型制作 根据预实验、大量文献资料和经验总结, 最后采用高分子石膏固定兔的后肢, 因此材料自身带孔, 有减压的作用, 而管型接口处不连接粘死, 可以有一定弹性, 避免了石膏过紧, 起到一定的松解减压作用, 高分子石膏近似熟料, 表面光滑, 不易和兔皮毛粘连, 且易拆卸更换, 每隔3周左右, 更换石膏松解或重新固定。在兔右后肢屈髋伸膝位时用管型石膏固定8周以制作髋关节脱位动物模型<sup>[1-4]</sup>。经过8周固定, 通过X射线片、髋臼指数、股骨头脱位程度判定有48只大白兔出现髋臼发育不良, 说明造模成功。

1.4.2 实验分组 固定的右后肢作为实验组, 同只兔的左后肢不做任何处理作为对照组。固定8周后根据X射线片、髋臼指数、股骨头脱位程度判断造模情况。选取造模成功的48只兔, 根据兔右后肢不同的处理方式, 将实验组再分为A组(固定8周后立即麻醉下处死动物)、B组(固定10周后立即麻醉下处死动物)、C组(固定8周后解除固定复位2周后麻醉下处死动物), 每组16只。

1.4.3 标本处理 48只动物麻醉下空气栓塞法处死, 迅速解剖髋关节。取髋关节用线锯截断, 保留完整关节囊取得

双髌关节, 观测大体形态后, 将关节囊在股骨颈部切开, 观察髌关节形态学变化, 并拍照。髌关节新鲜标本立即以 40 g/L 多聚甲醛固定 48 h, 再置于 10% EDTA 中脱钙 10 周。彻底去除髌白唇, 取髌白后上方体积为 5 mm×5 mm×3 mm 的软骨组织两三块, 常规浸蜡, 制备蜡块, 供苏木精-伊红染色和免疫组织化学、TUNEL 法检测实验等使用。

1.4.4 苏木精-伊红染色 ①染色前: 乙醇逐级脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片; ②染色: 上行二甲苯、体积分数 100%、95%、80% 乙醇、苏木精、水洗、分化、水洗、返蓝、水洗、伊红、下行体积分数 80%、95%、100% 乙醇、二甲苯、中性树胶封固。

1.4.5 免疫组织化学步骤(S-P法) ①上行二甲苯、体积分数 100%、95%、90%、80% 的乙醇、PBS 冲洗 3 次; ②适量滴加 0.4% 胃蛋白酶液, 37 °C 温箱中湿盒孵育 30 min; PBS 冲洗 3 次; A 液滴加 50 μL, 37 °C 温箱中湿盒孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次; ③滴加 50 μL 的 B 液, 37 °C 温箱中湿盒孵育 10 min, 不洗, 甩液; ④滴加适当稀释的一抗 (Caspase-3、Bcl-2、4-HNE 抗体稀释浓度均为 1:150), 置于湿盒 4 °C 冰箱中过夜; ⑤C 液滴加 50 μL, 37 °C 温箱中湿盒孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次; ⑥滴加 D 液 50 μL, 37 °C 温箱中湿盒孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次; ⑦DAB 显色时, 显微镜下观察来终止显色反应。水洗、蓝染、分化、梯度脱水, 透明、封固。

1.4.6 TUNEL 步骤 ①常规脱蜡复水; ②体积分数 3% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中室温下 20 min, 蒸馏水洗 3 次; ③ 0.01 mol/L TBS (1:200) 稀释的蛋白酶 K 滴于标本片, 37 °C 消化 10 min。TBS 洗 3 次; ④取 TdT 和 DIG-dUTP 各 1 μL, 加入 18 μL 标记缓冲液中混匀, 甩去切片多余液后加标记混匀液 20 μL/片, 湿盒中 37 °C 标记 2 h; ⑤TBS 洗 3 次; ⑥封闭液滴加浓度为 50 μL/片, 室温 30 min, 甩掉封闭液, 不洗; ⑦生物素化抗地高辛抗体按照抗体稀释液 (1:100), 混匀后 1:100/片加至切片, 切片置于湿盒中在 37 °C 恒温箱 30 min, TBS 洗 3 次; ⑧取 1 mL (TBS) 并加入 10 μL (SABC), 混匀后 50 μL/片加至切片, 37 °C 下 60 min, TBS 洗 4 次; ⑨取 1 mL 蒸馏水于 EP 管中, 其次取 DAB 试剂盒中 A, B, C 试剂各 1 滴, 混匀后加至切片。镜下观察来控制反应时间; ⑩在苏木精中染核、常规的脱水、透明、中性树脂封固。

1.5 主要观察指标 ①X 射线示髌白指数; ②苏木精-伊红形态学观察, ③TUNEL 法显色后, 软骨细胞核内呈现棕黄色颗粒者为阳性表达, 未出现棕黄色颗粒为阴性表达; ④免疫组织化学光镜切片中见软骨细胞浆或细胞膜呈棕黄色者为阳性表达, 以 PBS 代替免疫组织化学试剂作为阴性对照。在 400 倍光镜下, 每张玻片采集 5 个视野, 在 Image pro-plus 软件中计算同一视野阳性表达的累计积分吸光度 (IA) 与细胞总面积 (Area) 的比值。

1.6 统计学分析 数据用 Excel 录入, 以  $\bar{x} \pm s$  的形式呈现, 通过 SPSS 21.0 进行 *t* 检验和 Pearson 相关分析, 检验标准

为  $\alpha=0.05$ ,  $P < 0.05$  差异为有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选入新西兰大白兔 60 只, 建模成功 48 只, 分为 3 组, 48 只进入结果分析。

2.2 髌白指数结果 见表 1。各组实验组髌白指数均显著高于对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); B、C 组实验组髌白指数均显著高于 A 组实验组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

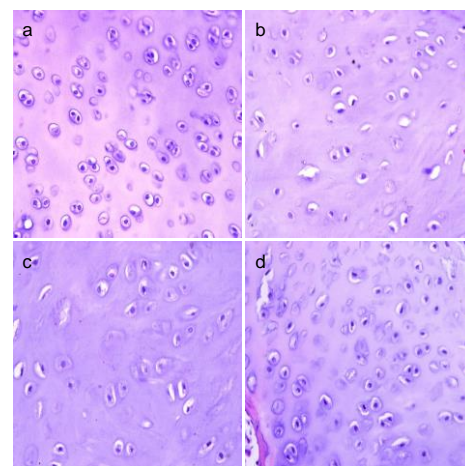
表 1 实验组与对照组髌白指数的变化 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=12$ )

Table 1 Changes in the acetabular index in the experimental and control groups

| 组别     | 髌白指数(°)                 | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值         |
|--------|-------------------------|------------|--------------------|
| A 组对照组 | 28.7±2.23               | -2.339     | 0.039 <sup>a</sup> |
| A 组实验组 | 31.1±2.27 <sup>a</sup>  |            |                    |
| B 组对照组 | 30.0±2.67               | -6.204     | 0.000 <sup>b</sup> |
| B 组实验组 | 37.3±3.98 <sup>bc</sup> |            |                    |
| C 组对照组 | 27.1±2.71               | -5.4165    | 0.000 <sup>b</sup> |
| C 组实验组 | 34.8±3.04 <sup>bc</sup> |            |                    |

表注: 对照组: 左后肢不做处理; A 组: 固定 8 周; B 组: 固定 10 周; C 组: 固定 8 周后解除固定复位 2 周。与同组对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与 A 组实验组比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$ 。

2.3 苏木精-伊红染色病理学观察 对照组软骨细胞形态规整, 见图 1a。A、B 组实验组出现空泡细胞, 部分结构消失, 见图 1b, c。C 组实验组髌白和股骨头关节软骨亦有破损和裂隙, 软骨细胞排列混乱, 大小不均, 较稀疏, 见图 1d。



图注: 图中 a 为对照组(左后肢不做处理); b 为 A 组(固定 8 周)实验组; c 为 B 组(固定 10 周)实验组; d 为 C 组(固定 8 周后解除固定复位 2 周)实验组。A、B 组实验组出现空泡细胞, 部分结构消失; C 组实验组髌白和股骨头关节软骨亦有破损和裂隙。

图 1 各组兔软骨细胞苏木精-伊红染色病理学观察(x400)

Figure 1 Pathological observation of the rabbit chondrocytes in each group (hematoxylin-eosin staining, x400)

2.4 免疫组织化学检测 Caspase-3、Bcl-2 结果

2.4.1 Caspase-3 表达 见表 2。各组实验组 Caspase-3 阳性表达积分吸光度值均显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ); B、C 组 Caspase-3 积分吸光度值与细胞总面积的比值显著高

于A组实验组( $P < 0.01$ )。

表2 Caspase-3在各组髋臼软骨细胞中表达的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )  
Table 2 Comparison of the expression level of Caspase-3 in acetabular chondrocytes among groups

| 组别    | 阳性表达(A)                         | 细胞总面积(Area)             | Caspase-3 表达 (IA/Area)        |
|-------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| A组实验组 | 92 367.5±7 868.7 <sup>a</sup>   | 9 641 007.8±1 482 121.1 | 0.009 7±0.001 3               |
| A组对照组 | 1 818.5±1 330.8                 | 9 755 581.4±184 019.4   |                               |
| B组实验组 | 198 067.8±20 068.8 <sup>a</sup> | 10 176 886.2±11 653.8   | 0.019 5±0.002 1 <sup>b</sup>  |
| B组对照组 | 1 818.5±1 330.8                 | 9 755 581.4±184 019.4   |                               |
| C组实验组 | 148 127.8±9 265.2 <sup>a</sup>  | 10 248 155.4±197 096.6  | 0.014 5±0.001 1 <sup>bc</sup> |
| C组对照组 | 1 818.5±1 330.8                 | 9 755 581.4±184 019.4   |                               |

表注: 对照组: 左后肢不做处理; A组: 固定8周; B组: 固定10周; C组: 固定8周后解除固定复位2周。与同组对照组比较,  $t=25.8, t=20.7, t=32.8$ , <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与A组实验组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与B组实验组比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$ 。

#### 2.4.2 Bcl-2表达 见表3。

表3 Bcl-2在各组髋臼软骨细胞中表达的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3 Comparison of the expression level of Bcl-2 in acetabular chondrocytes among groups

| 组别    | 阳性表达(A)                         | 细胞总面积(Area)             | Bcl-2 表达水平 (IA/Area)          |
|-------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| A组实验组 | 186 162.2±67 906.8 <sup>a</sup> | 8 266 594.4±2 469 296.8 | 0.022 3±0.003 0               |
| A组对照组 | 864.4±446.9                     | 10 011 264.2±328 097.5  |                               |
| B组实验组 | 139 659.6±32 335.7 <sup>b</sup> | 9 546 628.6±1 790 122.9 | 0.014 6±0.001 5 <sup>c</sup>  |
| B组对照组 | 864.4±446.9                     | 10 011 264.2±328 097.5  |                               |
| C组实验组 | 311 606.1±48 537.0 <sup>b</sup> | 9 495 041.2±588 908.3   | 0.032 8±0.004 0 <sup>cd</sup> |
| C组对照组 | 864.4±446.9                     | 10 011 264.2±328 097.5  |                               |

表注: 对照组: 左后肢不做处理; A组: 固定8周; B组: 固定10周; C组: 固定8周后解除固定复位2周。与同组对照组比较,  $t=6.1, t=9.5, t=14.3$ , <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与A组实验组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与B组实验组比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; 与C组实验组比较, <sup>d</sup> $P < 0.01$ 。

#### 2.5 TUNEL法检测结果 见表4。

表4 各组TUNEL法检测兔细胞凋亡指数 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 4 The apoptosis rate of chondrocytes in rabbits of each group detected by TUNEL method

| 组别    | 凋亡指数                          | t值    | P值                 |
|-------|-------------------------------|-------|--------------------|
| A组对照组 | 0.000 6±0.000 6               | 4.325 | 0.012 <sup>a</sup> |
| A组实验组 | 0.001 5±0.000 3 <sup>a</sup>  |       |                    |
| B组对照组 | 0.001 0±0.000 7               | 5.032 | 0.007 <sup>b</sup> |
| B组实验组 | 0.005 4±0.000 5 <sup>bd</sup> |       |                    |
| C组对照组 | 0.001 1±0.000 9               | 3.394 | 0.027 <sup>a</sup> |
| C组实验组 | 0.002 5±0.000 6 <sup>ac</sup> |       |                    |

表注: 对照组: 左后肢不做处理; A组: 固定8周; B组: 固定10周; C组: 固定8周后解除固定复位2周。与同组对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与A组实验组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 与B组实验组比较, <sup>e</sup> $P < 0.01$ 。

2.6 相关性分析结果 TUNEL测得凋亡率与Caspase-3进行相关性分析后Pearson相关系数为0.896, 表明凋亡程度与Caspase-3呈正相关性( $P < 0.05$ ); TUNEL测得凋亡率与Bcl-2进行相关性分析后Pearson相关系数为-0.571, 表

明凋亡程度与Bcl-2呈负相关性( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论 Discussion

此次研究显示在发育性髋脱位模型兔中存在Caspase-3阳性高表达, 实验组表达水平高于对照组, 说明发育性髋关节脱位模型中髋臼软骨的细胞凋亡与Caspase-3因子的异常高表达密切相关。

Bcl-2家族分为促凋亡类因子和抑制凋亡类因子, 其中Bcl-2是最重要的抗凋亡因子<sup>[10-12]</sup>。软骨细胞中Bcl-2能够抑制caspase的活性, 阻断凋亡信号转导途径, Bcl-2的抑制也能导致软骨蛋白多糖合成降低<sup>[13]</sup>。TUNEL与免疫组织化学结果显示, A组凋亡率低于B组凋亡率, 当兔右后肢固定8周细胞凋亡达到一定程度, 而固定到10周后, 细胞凋亡增多, 此时Bcl-2低于固定8周时的表达水平, 说明凋亡程度与Bcl-2呈负相关<sup>[14]</sup>。髋臼软骨中Bcl-2的低表达, 降低其维持线粒体膜的稳定方面作用。当Bcl-2表达降低时, II型胶原、连接蛋白、Sox9 mRNA显著降低<sup>[13, 15]</sup>。而A组软骨细胞中Bcl-2低于C组, B组低于C组表达水平, 表明复位法处理后Bcl-2表达水平上调, C组Bcl-2的抗凋亡效应增加, C组实验组细胞凋亡程度有所降低, 且苏木精-伊红染色结果也显示, C组软骨细胞接近正常对照组形态。有国外学者研究发现, 在关节软骨中, Bcl-2 mRNA的表达上调, 故骨性关节炎晚期软骨细胞凋亡增加, 但软骨退变却发展非常缓慢, Bcl-2的抑制作用可能是这一过程重要调控原因之一<sup>[16-19]</sup>。凋亡因子在软骨细胞中表达程度的报道不尽相同, 有研究认为在退变软骨细胞凋亡中Caspase-3的表达增高, Bcl-2的表达受抑制, 也有学者认为两者表达均升高<sup>[9, 11, 15, 20]</sup>。有学者认为退变软骨细胞Bcl-2的表达受抑制, Caspase-3的表达增高。研究结果表明, 髋臼软骨存在细胞凋亡高表达, 且与Caspase-3的高表达和Bcl-2的低表达及4-HNE的高表达具有正相关趋势。

细胞凋亡高表达在软骨退变中发挥着重要的角色, 随着造模时间的延长, 软骨退变进一步恶化, Caspase-3、Bcl-2表达的变化幅度不再那么显著。在发育性髋关节脱位模型髋臼软骨退变的早期, 可能由Caspase级联反应激活Caspase-3而引起的细胞凋亡增高占据主导作用, 充分压制了Bcl-2所调控的抑凋亡途径, 促凋亡机制发挥主导作用, 而抑制凋亡作用受到抑制或发挥作用不明显, 导致软骨进一步恶化<sup>[20-24]</sup>。

当软骨细胞退变中的凋亡水平达到一定程度, 抑制凋亡机制逐渐发挥作用, 促凋亡和抑凋亡机制相互影响, 并不断变化, 两者之间逐步达到一个相抗衡的水平, 促使凋亡进展过程变的缓慢, 对于外科医生而言在发育性髋关节脱位的治疗上提供了更好的切入点。如果关节软骨退变进入骨性关节炎阶段, 则可能促凋亡和抑凋亡调控机制会再度逐步发生变化, 其所发挥的作用份额将重新分配, 进行平衡, 抑制凋亡作用有可能会缓慢增强, 进一步延缓软骨

退变的过程。这样就解释了为什么骨性关节炎这种疾病的病变过程如此漫长。

此外, 还有国内学者研究结果显示, 发育性髌脱位髌关节软骨表层凋亡率无明显差异, 而肥大细胞层凋亡较正常减低, 但软骨呈现退变趋势, 认为可能是发育性髌脱位关节完全脱位后, 髌白软骨失去股骨头应力刺激的反应。这与作者研究的结论有些差异, 此次实验选取的软骨为髌关节脱位过程中压应力最集中的区域, 此处髌白软骨发生磨损较重, 髌白适应应力增生畸形生长的同时使软骨面积更大, 易于取材。而实验暂未进行髌白其他区域软骨的检测, 未进行软骨细胞不同层次的比较。可以提出这样的假设, 发育性髌关节脱位髌白软骨中的凋亡情况是根据压应力的变化, 不同的区域呈现不同的表达, 受不同凋亡因素的影响。闭合复位后实验组Bcl-2表达升高, Caspase-3表达下降, 作者认为抑凋亡机制发挥了主要作用, 抑制凋亡作用增强, 进一步延缓了软骨退变, 并且向恢复软骨退变的方向发展。

**结论:** 此次实验中发育性髌关节脱位会引发髌白软骨细胞相应凋亡因子表达异常, 异常表达的细胞凋亡造成髌白软骨的发育障碍。发育性髌关节脱位经过手法复位后, 能够降低部分凋亡因子的表达水平, 延缓软骨进一步退变的进程, 从而减缓患者的病情恶化的病程。但是手法复位后, 凋亡程度仍高于正常状态的水平, 说明发育性髌关节脱位中髌白软骨细胞的病理态恢复到正常态可能需要相当长的时间。总之, 发育性髌脱位中髌白软骨的细胞凋亡调控机制极其复杂, 髌白软骨退变中还通过何种复杂的途径引起细胞凋亡, 都有待于进一步深入研究。

**作者贡献:** 实验设计、实施和评估均为第一作者和通讯作者, 第一作者成文, 通讯作者审核。

**经费支持:** 该文章没有接受任何经费支持。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

**伦理问题:** 实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE指南)。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

[1] 尹志强, 潘惟丽, 金昊, 等. 骨性关节炎病因的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(7):1369-1371, 89.

- [2] 韦宜山, 刘万林, 丁良甲, 等. 发育性髌脱位髌白软骨细胞病理学改变的实验研究[J]. 内蒙古医学院学报, 2012, 34(6):447-452.
- [3] 王炳海, 韦宜山, 丁良甲, 等. 发育性髌关节脱位早期髌白软骨细胞凋亡与Bcl-2、Bax表达的相关性研究[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(20):3301-3303.
- [4] 边红飞, 韦宜山. 发育性髌关节脱位的病理与细胞凋亡的研究进展[J]. 内蒙古医学院学报, 2012, (S1): 211-215.
- [5] Eskes R, Desagher S, Antonsson B, et al. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol*. 2000;20(3):929-935.
- [6] Vervoessem T, Kerkhofs M, La Rovere RM, et al. Bcl-2 inhibitors as anti-cancer therapeutics: The impact of and on calcium signaling. *Cell Calcium*. 2017 Jun 4. pii: S0143-4160(17)30103-3.
- [7] Birkinshaw RW, Czabotar PE. The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. *Semin Cell Dev Biol*. 2017 Apr 8. pii: S1084-9521(17)30189-1.
- [8] Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond: mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J*. 2017 Jul 29.
- [9] Mosadegh M, Hasanzadeh S, Razi M. Nicotine-induced damages in testicular tissue of rats; evidences for bcl-2, p53 and caspase-3 expression. *Iran J Basic Med Sci*. 2017;20(2):199-208.
- [10] Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, et al. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science (New York, NY)*. 1995;270(5240):1326-1331.
- [11] Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science (New York, NY)*. 1997;275(5303):1132-1136.
- [12] Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74(4): 609-619.
- [13] Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
- [14] Dang AC, Kim HT. Chondrocyte apoptosis after simulated intraarticular fracture: a comparison of histologic detection methods. *Clin Orthop Relat Res*. 2009;467(7):1877-1884.
- [15] Pelletier JP, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis Rheum*. 2000;43(6):1290-1299.
- [16] Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol-Cell Ph*. 2007;292(1): C45-C51.
- [17] Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci*. 2009;122(4): 437-441.
- [18] Zhang H, Li Q, Li Z, et al. The protection of Bcl-2 overexpression on rat cortical neuronal injury caused by analogous ischemia/reperfusion in vitro. *Neurosci Res*. 2008;62(2):140-146.
- [19] 朱玉山, 卢铁元, 王蕊, 等. Bcl-2家族蛋白调控线粒体膜通透性和细胞色素C释放的新机制[J]. 生命科学, 2011, 23(11):1076-1080.
- [20] Pu X, Storr SJ, Zhang Y, et al. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. *Apoptosis*. 2017;22(3):357-368.
- [21] Cory S, Roberts AW, Colman PM, et al. Targeting BCL-2-like Proteins to Kill Cancer Cells. *Trends Cancer*. 2016;2(8):443-460.
- [22] Eichhorn L, Nietzel C, Schröder S, et al. A single air dive induces apoptotic gene regulation but no increase in nucleosomes. *Undersea Hyperb Med*. 2016;43(7):813-819.
- [23] Garner TP, Lopez A, Reyna DE, et al. Progress in targeting the BCL-2 family of proteins. *Curr Opin Chem Biol*. 2017;39:133-142.
- [24] Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jul 1. pii: S0006-291X(17)31321-9.