

基于 TMT 技术的激素性股骨头坏死硬化带修复模式探索及临床验证

庄至坤¹, 何敏聪^{2,3}, 林天烨^{2,3}, 吴荣凯¹, 郭金花¹, 吴昭克¹, 魏秋实^{2,3}<https://doi.org/10.12307/2024.301>

投稿日期: 2023-02-22

采用日期: 2023-04-14

修回日期: 2023-06-03

在线日期: 2023-06-21

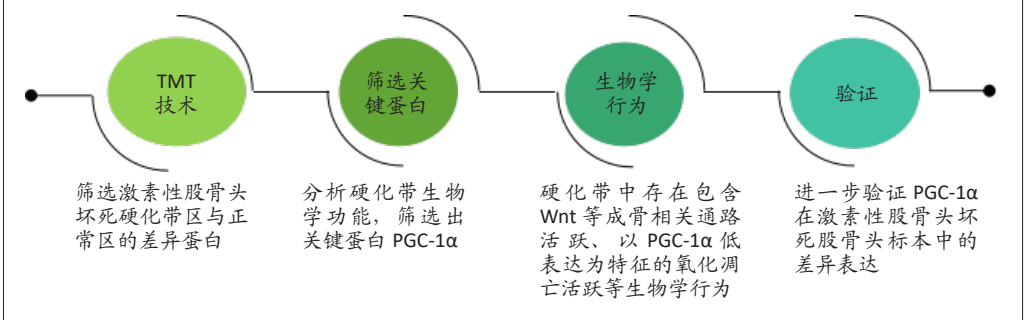
中图分类号:

R496; R318; R446

文章编号:

2095-4344(2024)14-02191-06

文献标识码: A

文章快速阅读: PGC-1 α 在激素性股骨头坏死硬化带中的表达

文题释义:

串联质谱标签(Tandem Mass Tags, TMT)技术: 定量蛋白质组学通过对质谱进行化学标记, 从而鉴定和定量蛋白质、核酸等生物大分子; 相较于以往常用的凝胶与抗体定量等蛋白组学, TMT的灵敏度、通量和可重复性等优势成为了目前蛋白质组学研究中的热门方法。

过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 协同刺激因子1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α , PGC-1 α): 作为一种多功能的转录共调节因子, 具有信号诱导的特异性, 能够灵敏应答于各种环境刺激和营养信号的改变, 并通过选择性地结合不同转录因子, 协同控制包括葡萄糖稳态、脂质代谢平衡和生物时钟稳态在内的多种生理进程。

摘要

背景: 股骨头内硬化带是激素性股骨头坏死疾病发展过程中重要的影像学特征并与预后相关。过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 协同刺激因子1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α , PGC-1 α)被证明具有成骨、促血管形成、抗线粒体凋亡等生物活性, 与激素性股骨头坏死的骨修复可能存在紧密关联。

目的: 筛选激素性股骨头坏死硬化带区与正常区的差异蛋白, 筛选出硬化带的关键蛋白, 并验证关键蛋白在激素性股骨头坏死股骨头标本中的差异表达; 探索激素性股骨头坏死硬化带修复模式。

方法: 取激素性股骨头坏死行人工全髋关节置换术取出的股骨头标本, 通过串联质谱标签技术筛选硬化带区与正常区的差异表达基因, 并进行GO与KEGG信号通路分析, 构建关键靶点的蛋白互作网络、筛选关键基因。观察关键蛋白在激素性股骨头坏死硬化带中的表达, 通过Western blotting、免疫组化验证关键蛋白在硬化带中的表达。

结果与结论: ①通过串联质谱标签定量蛋白质谱检测发现: 相比于正常区骨组织, 股骨头硬化带骨组织中具有显著差异表达(Log₂FC > 1.20、Log₂FC < 0.84和 P < 0.05)的蛋白质有609个, 其中发生上调的蛋白质290个, 发生下调的蛋白质319个; ②通过GO与KEGG通路富集分析, 发现在前10位的富集通路中, Wnt信号通路与生命周期调控通路与骨修复关系密切; 在生命周期调控通道中, PGC-1 α 是重要的蛋白之一; ③与激素性股骨头坏死标本正常区相比, Western blotting验证了PGC-1 α 、NRF-1在硬化带中低表达, Cleaved Caspase-3在硬化带中高表达; ④光镜下免疫组化结果显示, 股骨头组织标本中硬化区及正常区的PGC-1 α 、NRF1及Cleaved Caspase-3阳性染色分布, 可以发现骨小梁、成骨细胞和骨髓均有表达存在; 硬化带区Cleaved Caspase-3表达更为明显; ⑤结论: 激素性股骨头坏死硬化带中存在包含Wnt等成骨相关通路活跃、以PGC-1 α 低表达为特征的氧化凋亡活跃等生物学行为; PGC-1 α 在激素性股骨头坏死硬化带中低表达可能与氧化凋亡活跃相关。

关键词: 串联质谱标签; 激素性股骨头坏死; PGC-1 α ; 线粒体氧化凋亡; 骨修复

缩略语: 过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 协同刺激因子1 α : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α , PGC-1 α

Exploration and clinical validation of the repair mode of the sclerotic zone of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head based on Tandem Mass Tags technology

Zhuang Zhikun¹, He Mincong^{2,3}, Lin Tianye^{2,3}, Wu Rongkai¹, Guo Jinhua¹, Wu Zhaoke¹, Wei Qjushi^{2,3}

¹Department of Joint Diseases, Quanzhou Orthopedic-Traumatological Hospital, Quanzhou 362000, Fujian Province, China; ²Guangdong Research Institute for Orthopedics & Traumatology of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China; ³Department of Joint Diseases, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China

¹泉州市正骨医院关节科, 福建省泉州市 362000; ²广东省中医骨伤研究院, 广东省广州市 510000; ³广州中医药大学第三附属医院关节科, 广东省广州市 510000

第一作者: 庄至坤, 男, 1982年生, 汉族, 福建省泉州市人, 副主任医师, 主要从事骨关节疾病的基础与临床研究。

通讯作者: 魏秋实, 博士, 副主任医师, 博士生导师, 广东省中医骨伤研究院, 广东省广州市 510000; 广州中医药大学第三附属医院关节科, 广东省广州市 510000

并列通讯作者: 吴昭克, 主任医师, 硕士生导师, 泉州市正骨医院关节科, 福建省泉州市 362000

<https://orcid.org/0000-0002-1444-8346>(庄至坤)

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(82274544), 项目负责人: 魏秋实; 泉州市科技计划项目(2022NS011), 项目负责人: 庄至坤

引用本文: 庄至坤, 何敏聪, 林天烨, 吴荣凯, 郭金花, 吴昭克, 魏秋实. 基于 TMT 技术的激素性股骨头坏死硬化带修复模式探索及临床验证 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(14):2191-2196.



Zhuang Zhikun, Associate chief physician, Department of Joint Diseases, Quanzhou Orthopedic-Traumatological Hospital, Quanzhou 362000, Fujian Province, China

Corresponding author: Wei Qishi, MD, Associate chief physician, Doctoral supervisor, Guangdong Research Institute for Orthopedics & Traumatology of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China; Department of Joint Diseases, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China

Co-corresponding author: Wu Zhaoke, Chief physician, Master's supervisor, Department of Joint Diseases, Quanzhou Orthopedic-Traumatological Hospital, Quanzhou 362000, Fujian Province, China

Abstract

BACKGROUND: The sclerotic zone in the femoral head is an important imaging feature in the progression of steroid-induced femoral head necrosis, which is associated with disease prognosis. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) has been shown to possess biological activities such as osteogenesis, angiogenesis and anti-mitochondrial apoptosis, which may be closely related to bone repair of steroid-induced femoral head necrosis.

OBJECTIVE: To screen for the differential proteins in the sclerotic zone of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head versus the normal zone, to screen for hub proteins in the sclerotic zone, and to verify the differential expression of hub proteins in the femoral head specimens following steroid-induced femoral head necrosis, and to explore the repair pattern of the sclerotic zone following steroid-induced femoral head necrosis.

METHODS: Femoral head samples were collected from patients with steroid-induced osteonecrosis of the femoral head receiving total hip arthroplasty. The differentially expressed genes in the sclerotic zone and the normal zone were screened by Tandem Mass Tags and analyzed by GO and KEGG signaling pathways to construct a protein-protein interaction network and screen hub genes. In addition, the expression of hub genes in the sclerotic zone was verified by immunohistochemistry and western blot.

RESULTS AND CONCLUSION: Quantitative protein profiling by Tandem Mass Tags revealed that 609 proteins were significantly differentially expressed ($\text{Log}_2\text{FC} > 1.20$, $\text{Log}_2\text{FC} < 0.84$ and $P < 0.05$) in the sclerotic zone of the femoral head compared with the normal zone, of which 290 proteins were upregulated and 319 proteins were downregulated. The GO and KEGG pathway enrichment analyses revealed that among the top 10 enriched pathways, Wnt signaling pathway and life-cycle regulatory pathway were closely related to bone repair; in the life-cycle regulatory pathway, PGC-1 α was one of the important proteins. In addition, western blot results verified the low expression of PGC-1 α and NRF1 in the sclerotic zone and high expression of Cleaved Caspase-3 in the sclerotic zone compared with the normal zone of steroid-induced femoral head necrosis specimens. Light microscopic immunohistochemical results showed the distribution of PGC-1 α , NRF1 and Cleaved Caspase-3 positive expression in the sclerotic and normal zones in the femoral head tissue specimens, indicating the presence of their expression in bone trabeculae, osteoblasts and bone marrow. In contrast, the brown area of the sclerotic zone of femoral head necrosis stained darker and showed more obvious expression of Cleaved Caspase-3. To conclude, in the sclerotic zone of steroid-induced femoral head necrosis, biological behaviors including activation of osteogenesis-related pathways such as Wnt and oxidative apoptosis characterized by low expression of PGC-1 are observed. Low expression of PGC-1 α in the sclerotic zone of steroid-induced femoral head necrosis may be associated with the activation of oxidative apoptosis.

Key words: Tandem Mass Tags; steroid-induced osteonecrosis of the femoral head; peroxisome proliferative activated receptor γ coactivator 1 α ; mitochondrial oxidative apoptosis; bone repair

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 82274544 (to WQS); Quanzhou Science and Technology Program, No. 2022NS011 (to ZZK)

How to cite this article: ZHUANG ZK, HE MC, LIN TY, WU RK, GUO JH, WU ZK, WEI QS. Exploration and clinical validation of the repair mode of the sclerotic zone of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head based on Tandem Mass Tags technology. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2024;28(14):2191-2196.

0 引言 Introduction

股骨头缺血性坏死是骨科常见病、多发病，激素性股骨头坏死 (steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, SIONFH) 是最常见的骨坏死类型之一^[1]，骨重建失衡和骨组织细胞凋亡是激素性股骨头坏死发生与发展的重要病理过程。既往较多研究都将重点放在坏死区骨组织的代谢特征中^[2]，近年来激素性股骨头坏死各种非手术疗法、保髋手术的快速推广，非手术治疗和带塌陷生存逐渐成为重要的治疗手段^[3-7]，能否实现早期、快速的头内坏死组织修复，从而防止头内骨折导致头内不稳成了避免关节塌陷、延迟关节置换的关键之一。股骨头内硬化带是激素性股骨头坏死疾病发展过程中重要的影像学特点，硬化带的形态、部位及其变化与其预后相关^[8-9]，探索硬化带的生理病理机制、寻找可能的治疗靶点具有重要意义。

串联质谱标签 (tandem mass tags, TMT) 定量蛋白质组学通过对质谱进行化学标记，从而鉴定和定量蛋白质、核酸等生物大分子，相较于以往常用的凝胶与抗体定量等蛋白质组学，TMT 的灵敏度、通量和可重复性等优势成为了目前蛋白质组学研究中的热门方法^[10-12]。通过 TMT 蛋白质组学技术，可以初步探索局部组织的生物学行为特征，进一步通过生物信息学分析，可反映组织中的主要生物学行为趋势，为局部的生理病理变化提供线索。该研究通过 TMT 技术探索激素性股骨头坏死硬化带修复模式，进行生物学分析，筛选出关键蛋白；并进一步在激素性股骨头坏死全髋关节置换术后留取的股骨头标本中进行验证。

1 对象和方法 Subjects and methods

1.1 设计 TMT 技术筛选差异表达基因。计数资料采用 χ^2 检验，组间比较采用独立样本 t 检验。

1.2 时间及地点 试验于 2021 年 3-9 月在广州中医药大学完成。

1.3 对象 股骨头标本来自于广州中医药大学第三附属医院收治的因激素性股骨头坏死接受人工全髋关节置换手术的患者。该研究经广州中医药大学第三附属医院伦理委员会审批 (审批号: AF/SC-08/02.1)。

纳入标准: ①临床诊断为激素性股骨头坏死，且国际骨循环学会 ARCO 分期为 III b 期的患者^[13]；②行单侧人工全髋关节置换术者；③患者对治疗过程完全知情同意，并签署了知情同意书。

排除标准: ①存在心脑血管疾病、神经系统疾病、严重肝肾功能损害者；②存在如感染、肿瘤、全身免疫性疾病等可能影响骨组织分子检测结果的因素者。

1.4 主要仪器与试剂 组织切片机 (LEICA)；石蜡包埋机 (SAKURA)；荧光 PCR 仪 (ABI)；EASY-nLCTM 1200 色谱系统、微量紫外光度计、Q ExactiveTM HF-X 质谱仪、Multiskan FC 酶标仪 (Thermo Scientific)；低温高速离心机 (SCILOGEX)；MP Fastprep-24 匀浆仪 (MP Biomedicals)；超声破碎仪 (JY92-II)；电子天平 (Metler Toled AL104)；电子万能试验机 (JZL-D10KN, 160602)；TMT[®] Mass Tagging Kits and Reagents (Thermo Fisher)；Bradford 蛋白定量试剂盒 (Bio-Rad)；BCA 蛋白定量试剂盒 (弗德生物) 等。

1.5 方法

1.5.1 病理学观察

(1) 大体标本观察: 取激素性股骨头坏死患者骨标本的不同区域(坏死区、硬化带区、正常区)骨组织切片进行大体观察, 描述其病理结构特点、骨小梁、囊性变、肉芽组织与硬化带情况。

(2) 苏木精-伊红染色: 取上述骨组织, 置于 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 24 h, EDTA 微波脱钙, 经乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 5 μm 厚切片, 常规苏木精-伊红染色, 光镜下观察股骨头不同区域内骨小梁、骨细胞、髓腔脂肪细胞的变化。

1.5.2 蛋白质组学分析

(1) TMT 定量蛋白质分析: 分别取股骨头标本硬化带区与正常区骨组织, 加入 4 倍体积蛋白裂解液进行超声裂解, 提取总蛋白; 使用 Bradford 蛋白质定量试剂盒并配置 BSA 标准蛋白液进行蛋白质检测; 提取 120 μg 蛋白样品用 TMT 标记试剂标记, 分离馏分、液质检测, 最后生成质谱检测原始数据。

(2) 蛋白质的质谱数据分析: 使用 Proteome Discoverer™ Software 分析质谱检测出来的原始数据; 计算样本量间的差异性 (R 语言中 *t*. test 函数), 将蛋白质在样品间差异倍数 (Fold Change, FC) 转化为 Log_2 。根据 $\text{Log}_2\text{FC} > 1.20$ 、 $\text{Log}_2\text{FC} < 0.84$ 和 $P < 0.05$ 筛选差异蛋白, 并对股骨头内硬化带与正常区组织选出的差异蛋白进行质谱交集, 将二者具有显著差异的蛋白质进行表达模式聚类分析。

(3) 生物信息学分析: 应用 R 语言 (<https://www.r-project.org/>) 软件中 clusterProfilerGO.R 包及 Perl 语言对差异蛋白进行基因本体论 (gene ontology, GO) 功能富集分析, 描述其中包括细胞成分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 和生物学过程 (biological process, BP) 基因产物的功能。并应用 clusterProfilerKEGG.R 包进行京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析关键差异蛋白涉及的相关代谢通路, 同时利用 pathview 包绘制相应的信号通路图。

1.5.3 关键蛋白在临床标本中的表达与验证

(1) Western blotting 检测关键蛋白在临床标本中的表达: 股骨头标本硬化带区与正常区分别钳取骨组织, 按每 1 mg 骨组织加 3.5 μL 裂解液、PMSF、Cocktail 蛋白酶抑制剂; 研磨、匀浆, 冰上裂解 30 min 后将液体转移至 1.5 mL d Ep 管中, 低温高速 12 000 r/min 离心 30 min; 取上清液, 按 BCA 法配制蛋白标准溶液, 用酶标仪测吸光度, 然后推算出各蛋白浓度, 计算蛋白浓度标准化体积; 取蛋白样品各 100 μg , 加入上样缓冲液后, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴变性 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却 10 min 后 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电转移至 PVDF 膜。应用脱脂奶粉封闭液封闭, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱内孵 2 h, 取出 PVDF 膜后分别加入相关抗体 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱内孵 2 h, 取出 PVDF 膜后分别加入过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 协同刺激因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α , PGC-1 α)、NRF-1 多克

隆抗体 (Abcam, 1 : 1 000)、cleaved caspase 3 单克隆抗体 (1 : 1 000), 兔抗 β -actin 多克隆抗体 (1 : 2 000) 进行封膜, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日应用 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔及抗小鼠二抗 (1 : 5 000, TBST 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 1 h; TBST 漂洗后予以增强化学发光液于凝胶成像仪中曝光显影; 最后, 用 Image J 软件分析各组不同区域目标条带灰度值, 同时计算关键蛋白相对于内参蛋白的表达量。

(2) 免疫组化检测关键蛋白在临床标本中的表达: 取股骨头标本中硬化带与正常区骨组织 5 μm 厚的石蜡切片, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中烤 30 min; 二甲苯中脱蜡; 乙醇梯度水化; 柠檬酸钠缓冲液 (0.01 mol/L) 高压修复; 冷却完成后 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 加入体积分数 3% H_2O_2 除去内源性过氧化物酶, 阻断非特异性抗原结合; 加入一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 用 TBST 在室温下脱色摇床上漂洗 3 次, 加入生物素化二抗 30 min; 滴加二氨基联苯胺 (DAB) 溶液显色, 苏木精复染; 经脱水、干燥后封固, 在光学显微镜下检测关键蛋白的表达。

1.6 主要观察指标 ①股骨头病理学观察; ②股骨头硬化带区与正常区骨组织 TMT 蛋白质学分析结果; ③ PGC-1 α 、NRF-1、Cleaved Caspase-3 在激素性股骨头坏死临床标本中的表达与验证结果。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料采用 χ^2 检验, 组间比较采用独立样本 *t* 检验; $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章的统计学方法已经广州中医药大学统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 病理学观察结果

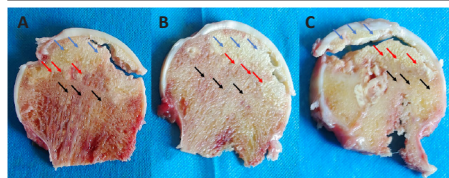
2.1.1 标本大体观察 可见股骨头内部结构分为坏死区、硬化带区和正常区; 均可见软骨下骨分离, 骨小梁连续性中断, 骨小梁吸收区域有囊变被肉芽组织替代; 坏死区为淡黄色致密组织, 硬化区为灰白色坚硬组织, 硬化带区下方为正常区。坏死区与硬化带区之间有死骨吸收、肉芽组织形成与血管新生的痕迹, 坏死区被软骨与硬化区包绕, 硬化带区与正常区紧密连接, 见图 1。

2.1.2 苏木精-伊红染色 可见坏死区骨质结构紊乱、骨陷窝空虚、骨小梁结构与连续性破坏; 硬化区骨质连续, 但不规则, 可见骨髓细胞、骨陷窝内填充骨细胞; 正常区脱钙后骨质较少, 可见骨髓细胞, 骨陷窝内填充骨细胞, 见图 2。

2.2 TMT 蛋白质组学分析结果

2.2.1 TMT 蛋白质谱差异表达分析 相较于正常区骨组织, 股骨头硬化带骨组织中具有显著差异表达 ($\text{Log}_2\text{FC} > 1.20$ 、 $\text{Log}_2\text{FC} < 0.84$ 和 $P < 0.05$) 的蛋白质有 609 个, 其中发生上调的蛋白质 290 个, 发生下调的蛋白质 319 个。火山图与热图见图 3。

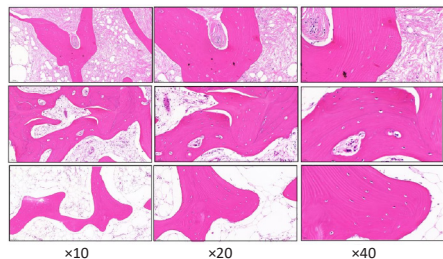
2.2.2 差异蛋白质的 GO 与 KEGG 功能富集分析 通过对股骨头硬化带区与正常区骨组织差异表达蛋白质进行 GO 富集,



图注：图 A 为 37 岁男性患者，左侧激素性股骨头坏死股骨头标本；B 为 45 岁男性患者，左侧激素性股骨头坏死股骨头标本；C 为 56 岁女性患者，右侧激素性股骨头坏死股骨头标本。蓝色箭头所示为坏死区；红色箭头所示为硬化区；黑色箭头所示为正常区

图 1 | 激素性股骨头坏死标本大体观察

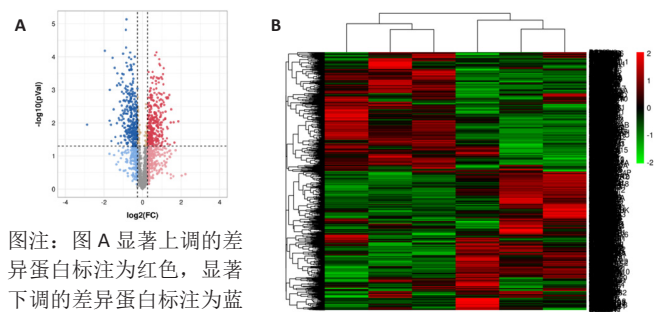
Figure 1 | Gross observation of steroid-induced femoral head necrosis specimens



图注：坏死区骨质结构紊乱、骨陷窝空虚、骨小梁结构与连续性破坏；硬化区骨质连续，但不规则，可见骨髓细胞、骨陷窝内填充骨细胞

图 2 | 激素性股骨头坏死股骨头标本各区域苏木精 - 伊红染色观察

Figure 2 | Hematoxylin-eosin staining of various regions of steroid-induced femoral head necrosis specimens



图注：图 A 显著上调的差异蛋白标注为红色，显著下调的差异蛋白标注为蓝色，无显著差异的蛋白标注为黑色；B 为差异表达蛋白质聚类分析结果

图 3 | 股骨头硬化带与正常区串联质谱标签蛋白质质谱差异表达分析

Figure 3 | Differential expression analysis of Tandem Mass Tags-labeled protein profiles between sclerotic and normal zones of the femoral head

得到 GO 富集柱状图，见图 4。将股骨头硬化带与正常骨组织差异蛋白进行 KEGG 富集通路分析，找出差异蛋白中有显著性富集的通路，见图 5。通过富集通路中，发现硬化带生物活动呈现复杂的多功能、多途径生物过程。在前 10 位的富集通路中，Wnt 信号通路是经典的成骨通路，生命周期调控通路与细胞氧化凋亡息息相关；因此推测在股骨头硬化带的生物途径中成骨表现活跃、氧化凋亡活跃是非常重要的生物学途径。随后，进一步做了 Wnt 信号通路与生命周期调控通路图，见图 6, 7。研究发现，在与氧化凋亡的生命周期调控通道中，PGC-1 α 作为重要的调控蛋白，发挥着积极的作用。结合文献报道 PGC-1 α 具有成骨、促血管形成、抗线粒体凋亡等生物活性^[14]，与激素性股骨头坏死的骨修复可能存在紧密关联；因此决定在激素性股骨头坏死的股骨头标本中进一步验证。

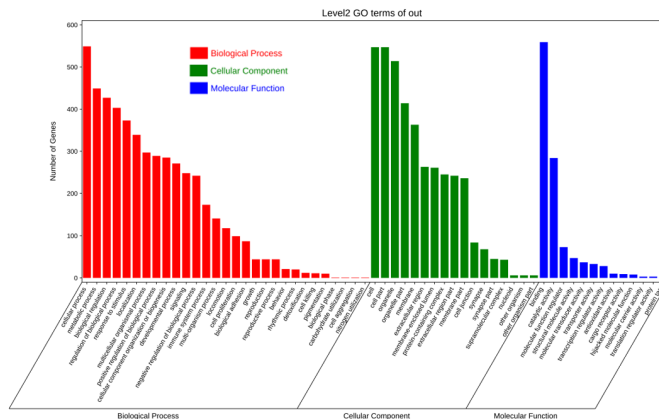


图 4 | 股骨头硬化带区与正常区骨组织差异表达蛋白 GO 富集生物学过程 (Biological Process)、细胞成分 (Cellular Component)、分子功能 (Molecular Function) 图

Figure 4 | Differentially expressed proteins in the sclerotic and normal zones of the femoral head distributed in GO biological process, cellular component, and molecular function

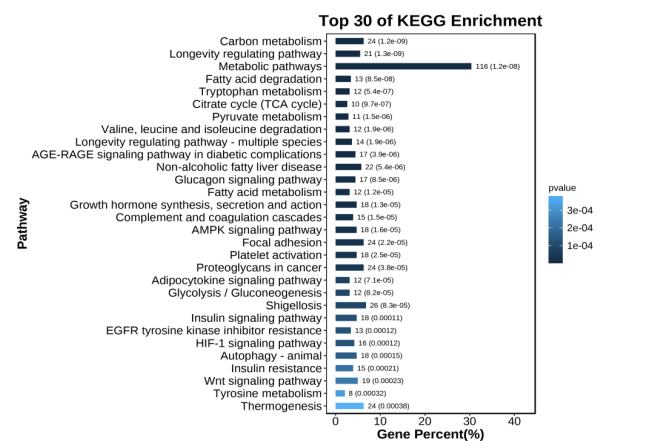


图 5 | 股骨头硬化带与正常骨组织差异表达蛋白 KEGG 富集分析

Figure 5 | KEGG enrichment analysis of differentially expressed proteins in the sclerotic and normal zones of the femoral head

2.3 PGC-1 α 、NRF-1、Cleaved Caspase-3 在激素性股骨头坏死临床样本中的表达与验证结果

2.3.1 Western blotting 分析 股骨头硬化区与正常区的蛋白免疫印迹条带灰度值结果发现，激素性股骨头坏死硬化带区 PGC-1 α /NRF-1 表达均低于正常骨质区 ($P < 0.05$)，Cleaved Caspase-3 表达高于正常骨区 ($P < 0.05$)，见图 8。

2.3.2 免疫组化分析 组织标本中硬化区及正常区 PGC-1 α 、NRF-1 及 Cleaved Caspase-3 的阳性染色分布可见骨小梁、成骨细胞和骨髓均有表达。相较而言，硬化带区股骨头坏死棕色区域染色较深，Cleaved Caspase-3 表达更为明显，见图 9。

3 讨论 Discussion

激素性股骨头坏死疾病发生后一般遵循“坏死 - 修复 - 塌陷 - 骨性关节炎”的病理过程^[15]，在其发展过程中，硬化带的出现和变化是非常重要的影像学特征。研究表明，硬化带是由于新骨沉积、骨小梁变粗且间隙变小所致，骨矿物质密度增加，为股骨头内骨修复的表现；影像学上表现为 X 射线片或 CT 上坏死区与正常区组织交界处不规则斑点状或条带

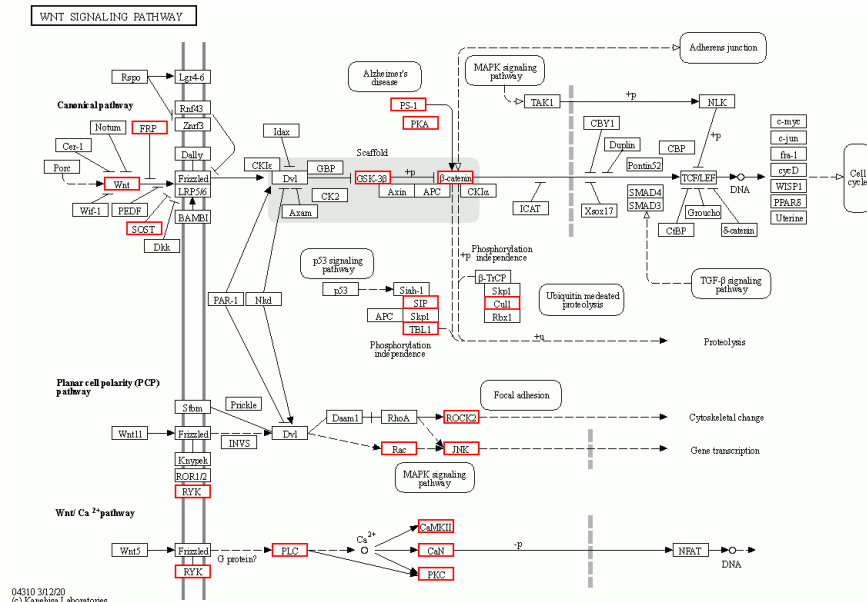


图 6 | 股骨头硬化带 Wnt 信号通路图
Figure 6 | Wnt signaling pathway in the sclerotic zone of the femoral head

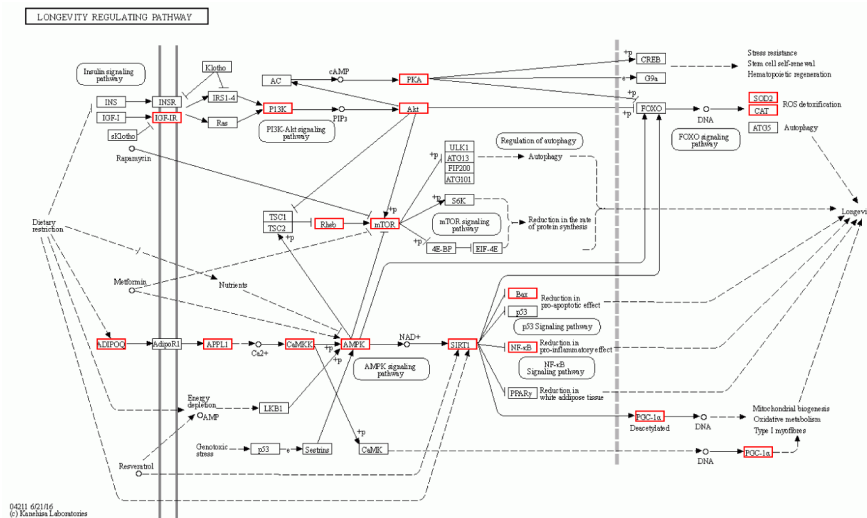
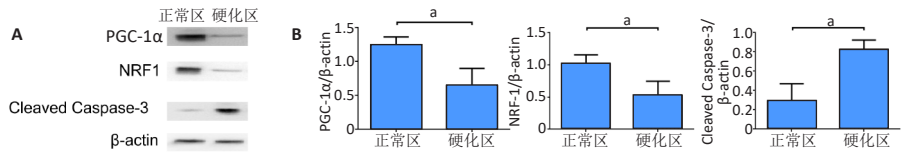
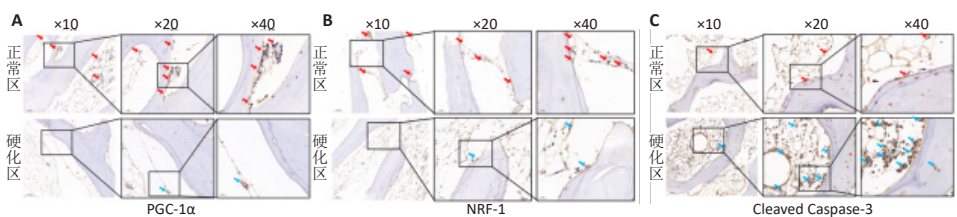


图 7 | 股骨头硬化带生命周期调控通路图
Figure 7 | Life-cycle regulatory pathways in the sclerotic zone of the femoral head



图注：图 A 为蛋白免疫印迹条带图；B 为蛋白统计分析图，^a*P* < 0.05。PGC-1α：过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 协同刺激因子 1α

图 8 | 激素性股骨头坏死股骨头标本正常区与硬化区 PGC-1α/NRF-1/Cleaved Caspase-3 蛋白的表达
Figure 8 | Expression of PGC-1α/NRF-1/Cleaved Caspase-3 protein in normal and sclerotic zones of the femoral head specimens after steroid-induced osteonecrosis of the femoral head



图注：图 A 为 PGC-1α 表达；B 为 NRF1 表达；C 为 Cleaved Caspase-3 表达。PGC-1α：过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 协同刺激因子 1α

图 9 | 激素性股骨头坏死股骨头标本正常区与硬化区 PGC-1α/NRF-1/Cleaved Caspase-3 表达 (免疫组化染色)
Figure 9 | Expression of PGC-1α/NRF-1/Cleaved Caspase-3 in normal and sclerotic zones of the femoral head specimens after steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (immunohistochemistry staining)

状密度增高影^[8]。大体标本硬化带区在 CT 上表现为高密度硬化带，呈不规则棕褐色带样，包绕坏死骨；镜下表现为沉积增厚的骨小梁^[16]。相关研究表明，硬化带与正常骨组织只是表现为形态结构的差异^[17]，其修复反应过程中形成的硬化带受到各种细胞因子、力学刺激及修复微环境的影响；一方面可以作为延缓股骨头塌陷的保护因素，另一方面在修复的交接地带形成过厚的硬化带也可能干扰甚至阻碍坏死灶的修复。某种程度上说，硬化带是骨坏死修复的一个重要体现，研究硬化带的生物学特点，有助于进一步认识硬化带的修复模式，为激素性股骨头坏死的治疗提供思路。

既往研究中采用 TMT 技术对股骨头坏死进行研究的文献报道不多，主要以股骨头坏死血清蛋白质组学为主^[18]，较少涉及股骨头标本组织。此次研究通过 TMT 蛋白质组技术对激素性股骨头坏死患者的股骨头硬化带区与正常区进行差异蛋白分析，最终筛选出在激素性股骨头坏死的修复过程中具有潜在重要作用的蛋白质与信号通路；通过 GO 与 KEGG 富集通路分析，发现硬化带生物活性是多功能、多途径的复杂生物过程。在排名前 10 的富集通路中，Wnt 信号通路具有促进骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化的作用，是转导途径中最经典的成骨通路^[19-20]。Wnt 通路活跃侧面验证了硬化带具有骨修复的生物活性；同时发现与细胞氧化调息相关的生命周期调控通道在硬化带中也可能起重要的作用，因此推测在股骨头硬化带的生物途径中除了成骨表现活跃、同时细胞氧化调亡也十分活跃。

PGC-1α 作为一种多功能的转录共调节因子，具有信号诱导的特异性，能够灵敏应答于各种环境刺激和营养信号的改变，并通过选择性地结合不同转录因子，协同控制包括葡萄糖稳态、脂质代谢平衡和

生物钟稳态在内的多种生理进程^[21-22]。随着研究的深入,证实 PGC-1 α 在多种细胞系中能强烈诱导 ERR α mRNA 表达,可有效加强骨髓间充质干细胞的促血管化能力,同时具有促进 Wnt/ β -catenin 通路上成骨特异靶基因表达的作用^[23-24]。PGC-1 α 作为生命周期调控通道中重要的调控蛋白,可能在激素性股骨头坏死的骨修复中发挥着重要的作用。研究表明,PGC-1 α 信号通路包括 PGC-1 α 、NRF1 和 NRF2; 其中, NRF-1 编码一种蛋白质,具有转录因子与同源二聚性的功能,能激活调节细胞生长的关键代谢基因的表达,参与线粒体 DNA 的转录和复制; PGC-1 α 信号通路的生理功能主要表现在线粒体的生物合成,能量代谢以及氧化应激方面^[25-26]。PGC-1 α 过表达可以通过促进线粒体生物合成,抑制活性氧的生成、维护线粒体功能完整从而抑制细胞凋亡^[27-28]。

Caspase 是细胞凋亡的核心成分, caspase-3 作为细胞凋亡途径的共同下游通路,是各种凋亡刺激因子中的关键蛋白酶和直接介导凋亡的效应蛋白^[29]。此次研究通过 TMT 测序,并进一步在激素性股骨头坏死标本中通过 Western blotting 与免疫组化试验研究发现,硬化带中 PGC-1 α 表达明显低于正常骨; NRF-1 表达与 PGC-1 α 呈现正相关,说明 PGC-1 α 通道介导的线粒体凋亡在硬化带中表现活跃。同时,试验发现硬化带中 Cleaved Caspase-3 表达明显高于正常骨,也说明硬化带中凋亡活跃。因此,作者认为硬化带在修复过程中,可能存在着线粒体凋亡活跃的生物行为。

综上,在这项研究中,发现激素性股骨头坏死硬化带中存在包含 Wnt 等成骨相关通路活跃、以 PGC-1 α 低表达为特征的氧化凋亡活跃等生物学行为。PGC-1 α 在激素性股骨头坏死硬化带中低表达可能与氧化凋亡活跃相关。结合既往研究表明,PGC-1 α 具有成骨、促血管形成、抗线粒体凋亡等生物活性,与激素性股骨头坏死的骨修复可能存在紧密关联^[14, 30]。过表达 PGC-1 α 有望通过抗线粒体凋亡、抑制骨细胞凋亡,从而促进骨修复,可能是激素性股骨头坏死修复的重要靶点。此次研究的不足之处:研究标本量较少,仅针对激素性股骨头坏死硬化骨的修复模式进行初步探索,后续需要在大量组织学、血清学标本中进一步验证。虽然此次研究发现了在硬化带里线粒体凋亡活跃这一生物学行为,但对于具体上游机制尚不明确。结合文献报道研究,推测其可能是激素性股骨头坏死发生与发展过程中局部应力集中产生,也可能是局部死骨吸收释放相关蛋白。以上推测均有待进一步深入研究,该结论尚未在动物实验中进一步验证。

作者贡献: 庄至坤负责试验实施、论文撰写,何敏聪、吴荣凯负责试验数据分析处理,林天焯、郭金花负责标本收集、指标检测,吴昭克负责数据和文章的校对,魏秋实负责试验设计。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊投稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] MONT MA, SALEM HS, PIUZZI NS, et al. Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head: Where Do We Stand Today?: A 5-Year Update. *J Bone Joint Surg Am.* 2020;102(12):1084-1099.
- [2] LIN T, CHEN W, YANG P, et al. Bioinformatics analysis and identification of genes and molecular pathways in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. *J Orthop Surg Res.* 2021;16(1):327.
- [3] 魏秋实,何伟,张庆文,等.岭南袁氏中医药防治股骨头坏死传承文化研究[J]. *新中医*,2022,54(23):216-220.
- [4] 何伟,刘子豪,周驰,等.非手术保髓治疗非创伤性股骨头坏死的临床研究[J]. *中国中西医结合杂志*,2020,40(2):176-181.
- [5] CHEN WH, GUO WX, LI JX, et al. Application of protective weight-bearing in osteonecrosis of the femoral head: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and observational studies. *Front Surg.* 2022;9:1000073.
- [6] CHEN W, LI J, GUO W, et al. Outcomes of surgical hip dislocation combined with bone graft for adolescents and younger adults with osteonecrosis of the femoral head: a case series and literature review. *BMC Musculoskelet Disord.* 2022;23(1):499.
- [7] 魏秋实,何晓铭,何伟,等.非手术保髓治疗 ARCO II 期股骨头坏死的临床疗效及影响因素分析[J]. *中华骨与关节外科杂志*,2022,15(6):424-430.
- [8] 石少辉.股骨头坏死硬化带的观察[D].北京:中国协和医科大学,2009.
- [9] 陈玥,刘敏,铁位有.基于 CT 影像的形态学对双侧股骨头坏死塌陷的危险因素分析[J]. *中国 CT 和 MRI 杂志*,2020,18(7):158-161.
- [10] 牟永莹,顾培明,马博,等.基于质谱的定量蛋白质组学技术发展现状[J]. *生物技术通报*,2017,33(9):73-84.
- [11] PAGEL O, KOLLIPARA L, SICKMANN A. Quantitative Proteome Data Analysis of Tandem Mass Tags Labeled Samples. *Methods Mol Biol.* 2021;2228:409-417.
- [12] PAPIREDDI N, MARTIN L, WÜHR M. A Review on Quantitative Multiplexed Proteomics. *ChemBiochem.* 2019;20(10):1210-1224.
- [13] YOON BH, MONT MA, KOO KH, et al. The 2019 Revised Version of Association Research Circulation Osseous Staging System of Osteonecrosis of the Femoral Head. *J Arthroplasty.* 2020;35(4):933-940.
- [14] 王慧婷,张岩晨,徐梦怡,等.能量代谢关键调控因子 PGC-1 α 的研究进展[J]. *生理学报*,2020,72(6):804-816.
- [15] 魏秋实,方斌,陈镇秋,等.股骨头前外侧骨质状态在股骨头坏死塌陷进展中的作用[J]. *中国组织工程研究*,2019,23(16):2516-2522.
- [16] TINGART M, BECKMANN J, OPOLKA A, et al. Influence of factors regulating bone formation and remodeling on bone quality in osteonecrosis of the femoral head. *Calcif Tissue Int.* 2008;82(4):300-308.
- [17] 于潼,谢利民.硬化带在股骨头坏死塌陷作用中的研究进展[J]. *医学综述*,2015,21(1):84-86.
- [18] 曾平,陈金龙,李金溢,等.创伤性股骨头坏死血清差异蛋白质组学的研究[J]. *中国矫形外科杂志*,2019,27(5):453-458.
- [19] 胡兆林,常峰.激素性股骨头坏死发病机制及相关信号通路研究进展[J]. *医学综述*,2022,28(3):466-470.
- [20] CHEN XJ, SHEN YS, HE MC, et al. Polydatin promotes the osteogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cells by activating the BMP2-Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Biomed Pharmacother.* 2019;112:108746.
- [21] CHENG CF, KU HC, LIN H. PGC-1 α as a Pivotal Factor in Lipid and Metabolic Regulation. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3447.
- [22] HALLING JF, PILEGAARD H. PGC-1 α -mediated regulation of mitochondrial function and physiological implications. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2020;45(9):927-936.
- [23] KONG S, CAI B, NIE Q. PGC-1 α affects skeletal muscle and adipose tissue development by regulating mitochondrial biogenesis. *Mol Genet Genomics.* 2022;297(3):621-633.
- [24] 陈黎,张世昌,张国英.基因过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 -1 α /雌激素相关受体 - α 共修饰间充质干细胞对血管化的影响[J]. *中华实验外科杂志*,2018,35(7):1203-1205.
- [25] 闫春雷,黄欣,苏乐群. PGC-1 α 的转录调节和翻译后修饰[J]. *中国生物化学与分子生物学报*,2015,31(1):12-19.
- [26] XIA SR, WEN XY, FAN XL, et al. Wnt2 overexpression protects against PINK1 mutant-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Mol Med Rep.* 2020;21(6):2633-2641.
- [27] 耿慧霞,李莺歌,石贞玉,等. PGC-1 α 过表达逆转 OGD/R 诱导的神经元线粒体功能降低和凋亡[J]. *中国病理生理杂志*,2017,33(11):2078-2083.
- [28] WALDMAN M, BELLNER L, VANELLA L, et al. Epoxyeicosatrienoic Acids Regulate Adipocyte Differentiation of Mouse 3T3 Cells, Via PGC-1 α Activation, Which Is Required for HO-1 Expression and Increased Mitochondrial Function. *Stem Cells Dev.* 2016;25(14):1084-1094.
- [29] HE Q, WANG T, NI H, et al. Endoplasmic reticulum stress promoting caspase signaling pathway-dependent apoptosis contributes to bone cancer pain in the spinal dorsal horn. *Mol Pain.* 2019;15:1744806919876150.
- [30] 温宇华,刘培培,宋利格. PGC-1 α 在骨代谢中的作用[J]. *同济大学学报(医学版)*,2021,42(2):266-270.

(责任编辑: WZH, ZN, WL, LCH)