

· 综 述 ·

激素性股骨头坏死中骨细胞凋亡的研究进展*

周正丽^{1,2}综述,张 潜¹审校

(1. 遵义医学院人体解剖学教研室, 贵州遵义 563003; 2. 泸州医学院人体解剖学教研室, 四川泸州 646000)

关键词: 股骨头坏死; 激素类; 细胞凋亡

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.34.038

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)34-3659-03

股骨头坏死是骨关节外科的常见疾病,疾病的最终发展可导致患者髋关节假体置换的无奈选择。目前,中国股骨头坏死患者有 500~750 万,每年新增病例约 7.5~15 万,激素是股骨头坏死发病的首要原因^[1]。但至今激素性股骨头坏死(steroid-induced avascular necrosis of the femoral head, SANFH)的发病机制尚未明确,可能与脂肪代谢紊乱、血管内凝血、骨内高压、骨质疏松、免疫因素及细胞凋亡等因素有关^[2]。尽管细胞凋亡的概念提出时间不长,但已有研究证实细胞凋亡机制紊乱会导致多种疾病的发生,因此人们尝试研究 SANFH 中细胞凋亡的作用,以探求 SANFH 的发病机制及治疗的最佳途径^[3]。本文就 SANFH 疾病中骨细胞凋亡的研究进展作一综述。

1 SANFH 细胞凋亡的形态学特征和检测方法

根据传统意义的理解,人们一直认为 SANFH 中骨组织的死亡是以骨坏死的形式进行的。其坏死的形态特征主要表现为骨细胞核固缩、骨细胞在陷窝内消失、空骨陷窝的增多,空骨陷窝计数常常作为 SANFH 病程进行性发展的判定指标^[4],尽管在 SANFH 骨组织标本中存有明显的如骨细胞消失及骨陷窝空虚等坏死现象,但始终缺乏与坏死直接相关的特征性证据,如细胞肿胀及炎症反应等。1998 年,Weinstein 等^[5]发现过量激素的应用能够影响骨髓中成骨细胞和破骨细胞形成机制,同时激素可诱导成熟的成骨细胞和骨细胞发生凋亡。因此,细胞凋亡与 SANFH 的关系逐渐进入人们的视线。细胞凋亡的形态学特征在 SANFH 中主要表现为骨细胞细胞核断裂成片段、细胞质浓缩、细胞表面微绒毛和细胞间连接逐步消失、凋亡小体的形成,通常以凋亡指数来描述细胞凋亡与 SANFH 疾病发展的递进关系^[6]。

细胞凋亡的检测方法众多,包括形态学检测法、生化特征检测法、流式细胞仪检测法等。在众多检测方法中,原位末端标志法因其简便、快捷、灵敏度和特异性较高,成为常备的 SANFH 细胞凋亡检测方法之一。Calder 等^[7]应用免疫组化方法、电泳法和脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的原位缺口末端标志法(TUNEL 法)研究人股骨头坏死的发病情况,证实 SANFH 骨组织标本中存有明显的骨细胞凋亡。熊明月等^[8]联合应用透射电镜和 TUNEL 法在早期兔 SANFH 骨组织标本中观察到着色明显的凋亡骨细胞。

2 SANFH 中细胞凋亡的作用

大多数学者已认可细胞凋亡与 SANFH 的发生、发展关系密切。但是, SANFH 骨死亡的本质是否为骨细胞凋亡,骨坏死与骨细胞凋亡是同时存在亦或先后发生,学术界呈现出不同的见解。程少华等^[6]应用大剂量激素制备早期兔股骨头坏死

动物模型,经 HE 染色法和 TUNEL 法在光镜和电镜下观察到细胞凋亡和骨坏死的同时发生。Calder 等^[7]对 SANFH 的患者进行研究,认为激素及其代谢产物的细胞毒性作用导致细胞凋亡的发生, SANFH 并非单纯的骨坏死。而 Kerachian 等^[9]对早期大鼠 SANFH 骨组织标本进行实验研究,认为细胞凋亡是早期 SANFH 的首要变化,骨坏死的发生未明显显现。杨俊兴等^[10]对激素、乙醇、外伤所致股骨头坏死标本进行 TUNEL 法检测发现,仅激素引起股骨头坏死标本中出现大量骨细胞凋亡,故认为 SANFH 的实质是细胞凋亡。Youm 等^[11]的研究结果也支持杨俊兴等^[10]的观点,即“骨死亡”是以细胞凋亡的形式发生。众多文献表明,激素似乎成为细胞凋亡的诱导剂,刺激着细胞凋亡的发生,并且伴随 SANFH 病情的进展,细胞凋亡率也持续性上升。李挺松等^[12]运用单纯激素诱导兔股骨头坏死动物模型,制模第 6 周发现有众多凋亡小体形成,随时间的推移观察到凋亡指数明显上升。石磊等^[13]调查研究 SANFH 患者的骨组织标本,也发现随股骨头坏死临床分期的推进细胞凋亡率进行性上升,他们认为骨坏死的出现是细胞凋亡持续性发展的结果。

众所周知,骨组织中包含有成骨细胞、骨细胞、破骨细胞和骨髓细胞。大多数 SANFH 文献报道,发生凋亡的主要是骨细胞和成骨细胞,破骨细胞极少见细胞凋亡的发生。O'Brien 等^[14]在鼠的基因中插入能使激素失活的基因来研究激素对骨细胞凋亡的潜在作用,结果发现激素能够直接作用于成骨细胞和骨细胞,并刺激其凋亡,但是破骨细胞未受影响。Calder 等^[7]在 SANFH 患者中也发现有广泛的骨细胞、成骨细胞和骨髓细胞凋亡的发生,但未提及破骨细胞的凋亡情况。Eberhardt 等^[15]在大剂量激素诱导兔股骨头坏死的标本中运用 TUNEL 法同样检测到骨细胞和成骨细胞凋亡的病变特点。Kerachian 等^[2]指出激素可以抑制骨细胞和破骨细胞前体的产生,增加骨细胞和成骨细胞的凋亡,延长破骨细胞的生命,从而导致骨组织生成量减少,造成骨量丢失。

3 SANFH 中细胞凋亡的信号转导通路研究进展

目前,与 SANFH 细胞凋亡相关的信号转导通路调控主要有两条,即死亡受体通路和线粒体通路。各种凋亡信号通过信号转导通路传达到细胞内,激活靶分子产生细胞效应,从而引发凋亡的产生。从分子生物学角度阐明细胞凋亡信号转导通路调控的机制,将有助于揭开 SANFH 细胞凋亡的原因。

在死亡受体通路中 Fas 是最典型的死亡受体之一^[16]。Kogianni 等^[17]经地塞米松诱导 MLO-Y4 骨细胞凋亡途径发现,骨细胞凋亡与 Fas 有关,并且依赖于 Caspase-8 蛋白,但

* 基金项目:遵义医学院研究生教育创新课题(99-024)。

Fas 的上调并不伴随 FasL 增量调节,即二者并不发生结合,故分析其凋亡途径可能类似于肿瘤细胞研究中抗癌剂的使用,Fas 不依赖 FasL 的存在而直接加速 Fas 受体三聚化,激活与 Fas 相关死亡域结合蛋白和 Caspase-8 通道途径,从而诱导凋亡的发生。Bcl-2 家族成员因其主要效应部位在线粒体,在线粒体通路中重要的细胞凋亡调控作用也越来越受到人们的重视^[18]。李洪涛等^[19]在兔 SANFH 中检测到模型组 Bcl-2 的低表达,并发现随病程的推进 Bcl-2 表达持续性降低,但具体的调控途径并未描述。暴淑英等^[20]研究发现,Bcl-2 表达较正常组明显减少,而 Caspase-3 的表达较正常组明显增多,至于 Bcl-2 减少与 Caspase-3 的增多之间的相关性,文章并未过多阐明。有研究证实,Bcl-2 家族蛋白具有成孔性质,推测它们可直接调节线粒体膜对关键性分子细胞色素 C 的通透性触发 Caspases 级联反应,从而诱发细胞凋亡^[21]。以上两条细胞凋亡信号转导通路的上游事件虽然不同,但最终都伴有 Caspase 的激活。Chua 等^[22]研究发现,激素可以活化成骨细胞 Caspase-1、-3、-6、-8、-9、-11、-12 活性,并且检测到有 PARP(poly ADP-ribose polymerase)、Lamin A 和 Bcl-xL 的提高,同时细胞色素 C 也可以检测到,但具体的机制并未阐明。Caspase-3 是迄今为止研究比较透彻的一个,是主要的效应分子,一旦被激活,即发生下游的级联反应,使凋亡产生^[23]。胡峰等^[24]研究发现,在 SANFH 疾病发展过程中,Caspase-3 活性显著升高,并随病程的进展呈上升趋势,初步证明了 Caspase-3 介导的细胞凋亡参与了 SANFH 发病过程。

SANFH 中细胞凋亡信号转导通路是多因素、多水平的复杂调控过程,尽管具体的机制尚未完全明确,学者们却发现氧含量变化与 SANFH 中细胞凋亡信号转导通路的调控密切相关。Tsuiji 等^[25]研究发现,在低氧状态下 p53 上调,细胞凋亡更容易发生,还证明在低氧并伴有高剂量激素状态下诱导细胞凋亡的 p53 基因和 Bcl-2 基因表达均下调,故认为在低氧状态下高剂量激素更易引起细胞凋亡。Zhu 等^[26]研究发现,死亡受体通路和线粒体通路都与其细胞凋亡机制有关,但死亡受体通路仅有较小的变化,因为 Fas/FasL 仅表现为轻微的增高,而 Bcl-2 蛋白水平明显下调,Bax 蛋白水平明显增高,这说明线粒体通路在低氧和激素双重条件下对细胞凋亡的发挥着主要作用,推测其机制可能与细胞色素 C 的释放及形成 Apaf-1/Caspase-9 复合体,从而启动 Caspase 级联反应有关。

4 小 结

综上所述,细胞凋亡对 SANFH 疾病的发生、发展中发挥重要的作用。虽然细胞凋亡的分子生物学机制尚未完全阐明,但已有学者针对目前发现的分子信号转导通路进行药物治疗取得一定疗效,这为 SANFH 疾病的药物治疗提供了一个新思路。

参考文献:

[1] 陈演. 股骨头坏死病因学研究的某些进展[J]. 华西医学, 2009,24(7):1899-1901.
 [2] Kerachian MA, Séguin C, Harvey EJ. Glucocorticoids in osteonecrosis of the femoral head: a new understanding of the mechanisms of action[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009,114(3/5):121-128.
 [3] Zaidi M, Sun L, Robinson LJ, et al. ACTH protects a-

gainst glucocorticoid-induced osteonecrosis of bone[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010,107(19):8782-8787.
 [4] 杨述华. 股骨头坏死诊断及治疗进展[M]. 大连: 中国骨与关节损伤杂志社, 2009,33-40.
 [5] Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids[J]. J Clin Invest, 1998, 102(2):274-282.
 [6] 程少华, 崔超, 常巍, 等. 激素性股骨头缺血性坏死细胞凋亡的实验研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2010, 24(4):368-370.
 [7] Calder JD, Buttery L, Revell PA, et al. Apoptosis—a significant cause of bone cell death in osteonecrosis of the femoral head[J]. J Bone Joint Surg Br, 2004, 86(8):1209-1213.
 [8] 熊明月, 王坤正, 党晓谦. 早期激素性股骨头坏死骨细胞凋亡的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(3):262-265.
 [9] Kerachian MA, Cournoyer D, Harvey EJ, et al. New insights into the pathogenesis of glucocorticoid-induced avascular necrosis: microarray analysis of gene expression in a rat model[J]. Arthritis Res Ther, 2010,12(3):2-12.
 [10] 杨俊兴, 徐传毅, 李厂杰, 等. 非创伤性股骨头坏死的骨细胞凋亡研究[J]. 实用医学杂志, 2006,22(18):2127-2129.
 [11] Youm YS, Lee SY, Lee SH, et al. Apoptosis in the osteonecrosis of the femoral head[J]. Clin Orthop Surg, 2010, 2(4):250-255.
 [12] 李挺松, 肖增明, 詹新立, 等. 激素性兔股骨头坏死骨形态学及细胞凋亡变化[J]. 临床与实验病理学杂志, 2010, 26(5):594-597.
 [13] 石磊, 张兵, 夏春. 股骨头坏死组织后半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶(Caspase-3)与细胞凋亡的关系[J]. 中国微创外科杂志, 2009,9(8):737-746.
 [14] 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[J]. Endocrinology, 2004,145(4):1835-1841.
 [15] Eberhardt AW, Yeager-Jones A, Blair HC. Regional trabecular bone matrix degeneration and osteocyte death in femora of glucocorticoid-treated rabbits[J]. Endocrinology, 2001,142(3):1333-1340.
 [16] Pellegrini M, Bath S, Marsden VS, et al. FADD and caspase-8 are required for cytokine-induced proliferation of hemopoietic progenitor cells[J]. Blood, 2005,106(5):1581-1589.
 [17] Kogianni G, Mann V, Ebetino F, et al. Fas/CD95 is associated with glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis[J]. Life Sci, 2004,75(24):2879-2895.
 [18] Leu JI, Dumont P, Hafey M, et al. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex[J]. Nat Cell Biol, 2004,6(5):443-450.
 [19] 李洪涛, 于雪峰, 程永志, 等. bcl-2 mRNA 在中药防治早期激素性股骨头坏死中的表达变化[J]. 中医药信息,

2011,27(5):94-97.

- [20] 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]. 中国组织工程与临床康复,2008,12(46):9095-9099.
- [21] Cheng EH, Wei MC, Weiler S, et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis[J]. Mol Cell, 2001,8(3):705-711.
- [22] Chua CC, Chua BH, Chen Z, et al. Dexamethasone induces caspase activation in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. Biochim Biophys Acta,2003,1642(1/2):79-85.
- [23] 赵瑞杰,李引乾,王会,等. Caspase 家族与细胞凋亡的关系[J]. 中国畜牧杂志,2010,46(17):73-78.

- [24] 胡峰,赵劲民,李晓峰,等. 早期激素性股骨头缺血性坏死模型的建立及半胱天冬酶 3 活性测定[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2010,14(20):3701-3704.
- [25] 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[J]. Pathobiology,2006,73(6):304-309.
- [26] Zhu ZH, Gao YS, Zeng BF, et al. The effect of dexamethasone and hypoxic stress on MC3T3-E1 cells[J]. Front Biosci,2011,16:2747-2755.

(收稿日期:2012-06-13 修回日期:2012-09-12)

· 综 述 ·

HPV 基因分型检测在宫颈病变诊治中的应用进展

龚 正¹综述,王 凤²审校

(1. 江苏省无锡市锡山人民医院检验科 214011;2. 江苏省无锡市第四人民医院检验科 214062)

关键词: HPV;基因分型;宫颈病变

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.34.039

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)34-3661-03

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一,其发病率在女性生殖道恶性肿瘤中居首位,成为严重威胁女性生命和健康的杀手。目前,筛查仍是预防和控制宫颈癌的主要手段。现已明确,高危型人乳头瘤病毒(HPV)持续感染是宫颈癌的主要病因,且不同 HPV 基因型致癌风险有差异,因此,HPV 分型检测已成为宫颈癌筛查的一个重要手段,现将 HPV 基因分型检测在宫颈病变诊治中的应用研究进展作一综述。

1 判断宫颈病变发生的风险,实现个体化诊治

1.1 不同 HPV 致癌风险不同 现已发现超过 100 种 HPV 基因型^[1]。根据 HPV 致癌性的高低,可以将 HPV 主要分为高危型和低危型两大类。高危型 HPV,如 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73、82 等,与子宫颈癌及子宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasm,CIN)的发生密切相关;低危型 HPV,如 HPV6、11、42、43、44 等,常引起外生殖器湿疣等良性病变或宫颈低度鳞状上皮内瘤变。大量研究表明,不同 HPV 基因型其致癌风险不同。Clifford 等^[2]研究发现,在 5 910 例 HPV 阳性的宫颈低度鳞状上皮内病变(LSIL)患者中,HPV16 是最常见的基因型,占 26.3%,其次为 HPV31(11.5%)、HPV51(10.6%)、HPV53(10.2%),但在 LSIL 和宫颈癌当中,HPV 基因型的分布与 LSIL 中 HPV 基因型的分布存在差异,这强调了不同基因型在致癌风险上的差异性。波特兰的一项大样本(20 810 例)研究表明,大于或等于 30 岁细胞学阴性的女性,在 10 年的前瞻性研究中,HPV16 或 HPV18 阳性的妇女的 CIN3+ 的累积发病率分别为 20.7%、17.7%,而其他高危型阳性的妇女,CIN3+ 的累积发病率仅为 1.5%;因此,应将 HPV16、18 从其他高危型区分出来,能鉴定具有最高 CIN3+ 风险的妇女^[3]。

1.2 不同高危型 HPV 感染的临床处理方案 目前,对 HPV 进行分型检测已得到了越来越多专家和学者的认可。通过

HPV 基因分型检测,可以对患者进行个体化评估,确定宫颈病变发生的风险程度,从而制定最佳的进一步处理方案。2009 年,美国阴道镜和宫颈病理学会(ASCCP)发布了 HPV 基因分型检测指南明确指出,对于 HPV 阳性而细胞学正常的 30 岁以上的妇女,如果是 HPV16 型或 18 型,则需立即进行阴道镜检查,而如果是其他 HPV 高危型,则在 12 个月后重复 HPV DNA 检测和细胞学检查。这样一来,既能够让大多数可能存在 CIN2、3 但细胞学假阴性结果的妇女早日接受阴道镜检查,也让 HPV16 和 HPV18 阴性的妇女安心随访 12 个月,而不必急于接受阴道镜检查。

1.3 同一高危型 HPV 持续感染风险更高 HPV 感染分为一过性感染和持续感染,HPV 持续感染可能导致病毒基因组 E6、E7 等整合到宿主细胞基因组中,引起宫颈上皮内瘤变以及宫颈癌的发生。研究发现,不同高危型的反复感染患宫颈高度病变的风险比为 192,而相同高危型的持续感染,患宫颈高度病变的风险比高达 813,由此可见,与不同基因型的反复感染相比,同一高危型 HPV 持续感染其宫颈病变的风险显著升高^[4]。对 HPV 感染者进行定期的分型检测,能了解是同一基因型的持续感染还是不同基因型的反复感染,从而预测宫颈病变的风险。

2 用于细胞学为 ASC-US 患者的分流

2001 年,ASCCP 共识指南中指出,间隔 6 个月连续两次重复细胞学检查、HPV 检测和单次阴道镜检查,均为对未明确诊断意义的非典型鳞状细胞(ASC-US)进行分流处理的有效方法^[5]。Solomon 等^[6]研究发现,采用 HPV 检测,对于检测 CIN3+ 的灵敏度为 96.3%,而重复细胞学的灵敏度为 85.3%。2004 年一项分析研究报道指出,对于 ASC-US 的分流处理,HPV 检测比细胞学检查具有更高的准确性^[7]。基于众多的研究结果,2006 年版 ASCCP 指南及 2008 年欧洲宫颈癌筛查质