

非创伤性股骨头坏死组织中 Ezrin 表达的相关性研究

罗正亮 李旭 尚希福

摘要 目的 探讨非创伤性股骨头坏死局部组织中 Ezrin 表达的变化及其临床意义。方法 采用免疫组化法和逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 对 38 例非创伤性股骨头坏死 (实验组) 和 16 例股骨颈骨折 (对照组) 组织中 Ezrin 的表达情况进行检测。结果 实验组中 Ezrin mRNA 表达水平低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。同时非创伤性股骨头坏死中 Ezrin 表达水平与性别、年龄、体重指数 (BMI)、职业及病因无关, 但与疾病分期有关。结论 Ezrin 可能参与非创伤性股骨头坏死的发病过程, 并可能起着重要调控作用。

关键词 非创伤性股骨头坏死; Ezrin; 相关性

中图分类号 R 681.22

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)06-0826-04

非创伤性股骨头坏死主要发生于 30~50 岁的成年人, 其男女发病率比约为 2.4:1, 是一种慢性的、致残性的疾病, 并最终导致关节塌陷、继发性关节炎, 常需要采用全髋关节置换术治疗^[1]。目前公认的发病因素主要包括: 激素、酒精以及某些特发性因素^[2], 然而对于其发病机制现主要集中在血管内皮细胞活性、骨髓间质干细胞分化能力方面的研究^[3-4]。Ezrin 蛋白是 ERM (ezrin/radixin/moesin) 蛋白家族成员之一, 是膜细胞骨架连接蛋白, 其分子长度为 585 个氨基酸, 相对分子质量约为 81 ku^[5]。

2014-02-17 接收

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金 (编号: KJ2013A160); 安徽省自然科学基金 (编号: 11040606Q10)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院骨二科, 合肥 230001

作者简介: 罗正亮, 男, 硕士研究生;

尚希福, 男, 博士, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: shangxifu@163.com

目前研究^[6-7]表明 Ezrin 蛋白在维持细胞极性、细胞活性、信号传导以及增殖、分化和凋亡以及血管生成等方面发挥重要的调控作用。尚未有相关文献报道在非创伤性股骨头坏死中 Ezrin 是否有特异性改变, 该研究旨在初步探讨非创伤性股骨头坏死局部组织中 Ezrin 表达的变化及其临床意义, 为非创伤性股骨头坏死的分子调控机制研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2011 年 10 月~2012 年 12 月在安徽医科大学附属省立医院骨科行全髋关节置换术切取的股骨头标本 54 例。结合影像学、临床症状诊断明确的非创伤性股骨头坏死 38 例作为实验组, 其中男 24 例, 女 14 例, 年龄 29~67 岁, 平均 51 岁; 按 Ficat 分期分为 III 期 11 例, IV 期 27 例; 服用激素者 20 例, 酗酒者 11 例, 原因不明者 7 例。诊断明确的新鲜股骨颈骨折 16 例作为对照组, 并排除心血管及免疫系统疾患, 无服用激素史以及烟酒嗜好患者。股骨头经冠状面对半切开后, 于坏死区与健存区之间的移行区取材, 一部分置于含 RNA 保存液的冻存管中, 然后迅速转入 -80 °C 冰箱中冻存备用, 另外一部分经 4% 中性福尔马林溶液固定, 13% 乙二酸四乙酸二钠脱钙后做成石蜡块备用。两组患者的一般临床特征对比差异无统计学意义。

1.2 主要试剂 鼠抗人 Ezrin 单克隆抗体 (美国 Sigma 公司); 山羊抗鼠 IgG-HRP、SP 免疫组化试剂盒、DAB 染色试剂盒 (北京中山金桥生物科技有限公司); 逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒 (日本

Results 15 studies were selected. Meta-analysis showed that the statistical differences of serum TK1 level between and breast cancer, benign breast disease and healthy people were significant, while it was insignificant between the group of lymph node metastasis and non-metastasis group, as well as the different stages. **Conclusion** Serum TK1 is useful for evaluating breast cancer and benign breast disease, whereas it might not be useful to predict the lymph node metastasis and different stage of breast cancer. However, we assume that not all studies were collected and the collected ones are of low methodological quality. Thus, high quality research with large samples and multi-centers are needed to further the knowledge of the application of TK1 to the breast disease.

Key words thymidine kinase 1; breast disease; breast cancer; Meta-analysis; TK1

TaKaRa 公司)。Ezrin (431 bp) 引物序列: 上游 5'-CCC TCC AGT TCA AGT TCC-3', 下游 5'-AAG CCA AAG GTC TGT TCC-3'; β -actin (252 bp) 引物序列: 上游 5'-ATG GAT GAT GAT ATC GCC GCG CTC-3', 下游 5'-TTT CTC CAT GTC GTC CCA GTT GG-3'。引物序列均由上海生物工程公司代为设计与合成。

1.3 实验方法 采用免疫组化 SP 法: 将石蜡块制成 5 μ m 厚切片, 经 65 $^{\circ}$ C 烤 30 min 后, 二甲苯脱蜡水化, 柠檬酸高温修复抗原, 加入鼠抗人 Ezrin 单克隆抗体 (1:150) 工作液, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 通用型二抗室温孵育 15 min, DAB 显色; 随后苏木精复染, 酒精梯度脱水、中性树胶封片。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。RT-PCR 操作如下: 取 50 mg 待测组织, 参照 TRIzol 说明书提取组织 RNA, 取 2 μ g RNA 进行逆转录 (RT) 及 PCR 反应。PCR 反应扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 32 个循环; 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。目的基因条带灰度值与管家基因 (β -actin) 灰度值的比值用于统计学分析, 实验重复 3 次。

1.4 结果判定 免疫组化结果的按照评分等级由两位病理科医师分别观察读片判定。根据染色强度和阳性细胞比例分别评分, 两者评分乘积 ≥ 4 分确定为阳性^[8]。染色强度: 按切片中细胞染色的深浅, 无着色或基本不着色为 0 分; 浅黄色为 1 分; 棕黄色为 2 分; 棕褐色为 3 分。阳性细胞比例: 每例随机观察 3 个高倍镜 ($\times 400$) 视野, 每个视野计数 100 个细胞, 计算 300 个细胞中阳性细胞所占百分比, 阳性细胞比例 $< 10\%$ 为 0 分; $10\% \sim 25\%$ 为 1 分; $26\% \sim 50\%$ 为 2 分; $51\% \sim 75\%$ 为 3 分; $> 75\%$ 为 4 分。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 t 检验, 率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法进行检验分析。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 双侧。

2 结果

2.1 Ezrin 蛋白在不同组织中的表达情况 免疫组化结果显示, Ezrin 阳性表达呈黄色或棕黄色, 定位于细胞质。其中 Ezrin 蛋白在实验组中阳性表达 12 例, 对照组中阳性表达 10 例, 实验组阳性率 (12/38) 明显低于对照组 (10/16), 两组之间差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.459, P < 0.05$)。见图 1。

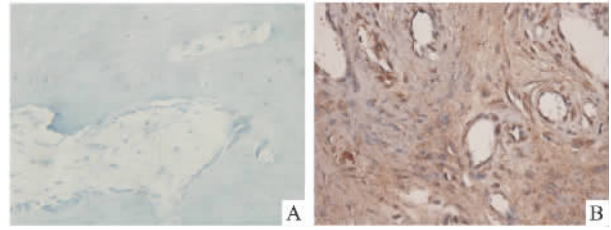


图 1 Ezrin 蛋白在不同组织中的表达 IHC $\times 400$
A: 实验组; B: 对照组

2.2 Ezrin mRNA 在不同组织中的表达差异 RT-PCR 结果分析显示 Ezrin mRNA 非创伤性股骨头坏死组织中的表达水平为 0.65 ± 0.17 , 而股骨颈骨折组织的表达水平为 1.58 ± 0.21 , 结果显示 Ezrin 基因在非创伤性股骨头坏死组织中的表达水平明显低于骨颈骨折组织, 差异有统计学意义 ($t = 17.105, P < 0.01$)。见图 2。

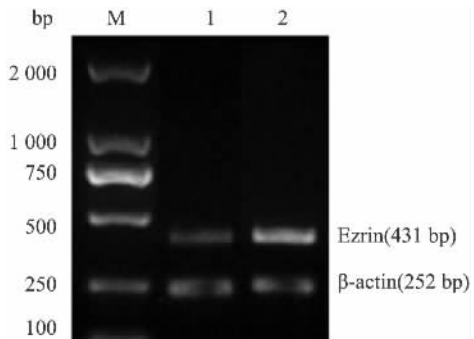


图 2 RT-PCR 检测 Ezrin mRNA 在不同组织中的表达
M: Marker; 1: 实验组; 2: 对照组

2.3 Ezrin 蛋白的表达与临床特征间的关系 Ezrin 蛋白在非创伤性股骨头坏死组织中的表达水平与患者性别、年龄、体重指数 (BMI)、职业及病因无明显相关性, 但与疾病分期有关 ($P < 0.05$)。见表 1。

3 讨论

由于骨坏死目前没有特效的指标药物, 只能延缓病情, 而骨坏死患者发病率较高并呈逐年上升趋势, 并且其发病机制仍存在争议。目前提出的假说包括: 血管内凝血、脂肪代谢紊乱、骨髓内压力升高、细胞凋亡、骨质疏松学说等^[9]。这些假说虽然侧重点各不相同, 但主要研究均集中于血管内皮细胞活性及骨髓间质干细胞分化能力, 并已证实, 在骨坏死部位, 血管内皮细胞活性降低、凋亡增加、骨髓干细胞分化能力降低紊乱, 造成骨坏死的修复机制受损^[3-4], 最终引起股骨头坏死改变。

表1 实验组中 Ezrin 的表达与临床特征之间的关系

项目	n	Ezrin		χ ² 值	P 值
		阴性 (n = 26)	阳性 (n = 12)		
性别					
男	24	14	10	3.068	0.080
女	14	12	2		
年龄(岁)					
≤50	16	11	5	0.001	0.970
>50	22	15	7		
BMI(kg/m ²)					
≤25	17	10	7	1.311	0.252
>25	21	16	5		
职业					
体力	20	14	6	0.049	0.825
非体力	18	12	6		
病因					
激素性	20	14	6	0.530	0.767
酒精性	11	8	3		
特发性	7	4	3		
Ficat 分期					
Ⅲ期	11	4	7	7.363	0.007
Ⅳ期	27	22	5		

Ezrin 首先于 1981 年在鸡的肠上皮绒毛中被发现,其编码基因位于染色体 6q25-q26^[10]。现已证实 Ezrin 蛋白以非活化和活化两种状态存在,并且在新血管生成、内皮细胞通透性、细胞凋亡、分化、增殖以及肿瘤转移的过程均发挥着重要生物活性作用。Youn et al^[11]报道在钙蛋白酶介导的内皮细胞血管生成机制中,Ezrin、PI3K、Akt、5'-AMP 激活性蛋白激酶这一系列的信号级联反应调节血管内皮生长因子(VEGF)诱导内皮细胞氮氧化物合酶生成 eNOS,从而最终发挥血管生成作用。另外,Kishore et al^[12]报道肿瘤坏死因子 α(TNF-α)可通过 Rho 激酶诱导 Ezrin 活化,活化的 Ezrin 蛋白进入细胞核与细胞周期素 A(cyclin A)的启动子结合,从而调节微血管内皮细胞的增殖、血管生成以及渗透性。在细胞凋亡方面,Kuo et al^[13]采用基因敲除技术使 Ezrin 表达缺失,导致 T 淋巴细胞和 H9 细胞凋亡增加,认为 Ezrin 能负性调节死亡诱导信号复合体(death-inducing signal complex, DISC)诱导的细胞凋亡。Ezrin 是一种细胞骨架蛋白与细胞膜之间的连接蛋白,使细胞感受细胞内外的应力调节,从而改变干细胞的分化调节;Titushkin et al^[7,14]通过 RNAi 敲除骨髓间质干细胞的 ERM 基因后不仅导致了干细胞的应力调节发生变化而且发现直接损伤了干细胞的成骨、成脂分化能力。另外,Huang et al^[15]发现在类风湿性关节炎的滑膜组织中,ERM 蛋白家族的磷酸化水平增高,使成纤维样滑膜细胞增殖能力增强,并指出抑制 ERM 蛋白家族磷酸化可能成为类风湿性关节

炎的一个新治疗靶点。本研究显示,Ezrin 蛋白水平和 Ezrin mRNA 水平在实验组的表达量均较对照组明显降低,并且 Ezrin 蛋白阳性表达水平与性别、年龄、BMI、职业及病因无关,但与疾病分期有关。因此,笔者认为 Ezrin 在非创伤性股骨头坏死中表达可能产生了变化,造成新生血管减少、内皮细胞凋亡增加以及骨髓基质干细胞分化能力降低紊乱,并可能参与非创伤性股骨头坏死的发生发展。

参考文献

- [1] Jones L C, Hungerford D S. The pathogenesis of osteonecrosis [J]. *Instr Course Lect*, 2007, 56: 179-96.
- [2] Malizos K N, Karantanas A H, Varitimidis S E, et al. Osteonecrosis of the femoral head: etiology, imaging and treatment [J]. *Eur J Radiol*, 2007, 63(1): 16-28.
- [3] Séguin C, Kassir J, Busque L, et al. Non-traumatic necrosis of bone (osteonecrosis) is associated with endothelial cell activation but not thrombophilia [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2008, 47(8): 1151-5.
- [4] Lee J S, Lee J S, Roh H L, et al. Alterations in the differentiation ability of mesenchymal stem cells in patients with nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: comparative analysis according to the risk factor [J]. *J Orthop Res*, 2006, 24(4): 604-9.
- [5] Bretscher A, Edwards K, Fehon R G. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(8): 586-99.
- [6] Fais S, De Milito A, Lozupone F. The role of FAS to ezrin association in FAS-mediated apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2005, 10(5): 941-7.
- [7] Titushkin I, Cho M. Altered osteogenic commitment of human mesenchymal stem cells by ERM protein-dependent modulation of cellular biomechanics [J]. *J Biomech*, 2011, 44(15): 2692-8.
- [8] 葛腾飞,朱克超,于在诚,等. Caveolin-1 在食管鳞癌中的表达及其临床意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(5): 544-7.
- [9] Assouline-Dayana Y, Chang C, Greenspan A, et al. Pathogenesis and natural history of osteonecrosis [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2002, 32(2): 94-124.
- [10] Rasmussen M, Alexander R T, Darborg B V, et al. Osmotic cell shrinkage activates ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins: activation mechanisms and physiological implications [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 294(1): C197-212.
- [11] Youn J Y, Wang T, Cai H. An ezrin/calpain/PI3K/AMPK/eNOSs1179 signaling cascade mediating VEGF-dependent endothelial nitric oxide production [J]. *Circ Res*, 2009, 104(1): 50-9.
- [12] Kishore R, Qin G, Luedemann C, et al. The cytoskeletal protein ezrin regulates EC proliferation and angiogenesis via TNF-α-induced transcriptional repression of cyclin A [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(7): 1785-96.

经枕外侧小脑绒球下入路中血管神经复合体显微解剖

程宏伟 单明 冯春国 李志范 肖瑾 罗靖 张科

摘要 目的 研究经枕外侧小脑绒球下入路对中血管神经复合体的暴露,为临床面肌痉挛血管减压术提供解剖学参考。方法 湿尸头上模拟枕外侧小脑绒球下入路显微手术,选择乳突切迹后下方与后颅凹外下方交界区开窗,并沿乙状窦内下侧视野显微暴露并观察;术毕将骨窗及术野上移,行枕下乙状窦后入路下视野暴露并显微观察。结果 ① 经枕外侧小脑绒球下入路可显露中后部桥小脑角区,充分暴露面听神经;经舌咽神经与小脑绒球间隙可直视中血管神经复合体相关结构,手术减压有效、安全、彻底;② 枕下乙状窦后入路暴露中血管神经复合体手术创伤大,暴露角度受限,术中操作困难。结论 经枕外侧小脑绒球下入路行面肌痉挛血管减压术视野暴露充分,手术操作安全,减压效果彻底,值得临床推广。

关键词 枕外侧小脑绒球下入路;中血管神经复合体;显微解剖;血管减压术

中图分类号 R 651.3; R 652.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)06-0829-04

中血管神经复合体位于幕下桥小脑角(cerebellopontine angle, CPA)区,是面听神经及其相关结构的总称,主要包括面听神经、小脑前下动脉(anterior inferior cerebellar artery, AICA)、小脑中脚及其岩骨面、桥脑及小脑裂^[1],是临床面肌痉挛发病的解剖学基础。面肌痉挛手术治疗的关键是充分暴露中血管神经复合体,尽量避免对周围血管、神经的损伤。近年来,临床治疗面肌痉挛常采用枕下乙状窦后入路行血管减压术,但经上述入路术野显露不足、术中操作困难,且常因对小脑及颅神经的过度牵拉导致较为严重的后果而疗效不佳。鉴于此,笔者设计行枕外侧小脑绒球下入路对中血管神经复合体进行暴露,并通过相关显微观测研究,为临床面肌痉挛血管减压治疗提供解剖学参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 成人湿尸头标本 8 具,其中男 5 具,女 3 具,10% 甲醛溶液固定标本,动脉采用红溶

2014-01-05 接收

基金项目:安徽省科技攻关项目(编号:12010402113)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院神经外科,合肥 230022

作者简介:程宏伟,男,博士,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: chw001@163.com

[13] Kuo W C, Yang K T, Hsieh S L, et al. Ezrin is a negative regulator of death receptor-induced apoptosis [J]. *Oncogene*, 2010, 29 (9): 1374-83.

[14] Titushkin I, Sun S, Paul A, et al. Control of adipogenesis by ezrin, radixin and moesin-dependent biomechanics remodeling [J].

J Biomech 2013, 46(3): 521-6.

[15] Huang H, Xiao Y, Lin H, et al. Increased phosphorylation of ezrin/radixin/moesin proteins contributes to proliferation of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2011, 50(6): 1045-53.

The expression of Ezrin and its correlation in nontraumatic osteonecrosis of femoral head

Luo Zhengliang, Li Xu, Shang Xifu

(Dept of Orthopaedics, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the expression level of Ezrin and its clinical significance in nontraumatic osteonecrosis of femoral head. **Methods** Expression level of Ezrin in 38 patients with nontraumatic osteonecrosis of femoral head (experimental group) and 16 patients with femoral neck fractures (control group) were detected by immunohistochemistry and RT-PCR analysis. **Results** The expression level of Ezrin was significantly lower in experimental group than that in control group ($P < 0.05$). It was correlated with the Ficat Stage, and had no relationship with gender, age, BMI, profession and etiological factor. **Conclusion** Ezrin may involve in the development of nontraumatic osteonecrosis of femoral head, and play an important role in regulation.

Key words nontraumatic osteonecrosis of femoral head; Ezrin; correlation