

· 临床论著 ·

## 非创伤性股骨头坏死患者血清 Bax/Bcl-2 意义<sup>△</sup>

纪沅轩<sup>1,2</sup>, 李国鹏<sup>3</sup>, 张维民<sup>4</sup>, 韦标方<sup>2\*</sup>

(1. 锦州医科大学, 辽宁锦州 121000; 2. 临沂市人民医院股骨头专科, 山东临沂 276000; 3. 潍坊医学院, 山东潍坊 261000; 4. 滨州医学院, 山东烟台 264000)

**摘要:** [目的] 探究非创伤性股骨头坏死 (non-traumatic osteonecrosis of the femoral head, NONFH) 血清 Bax/Bcl-2 检测的意义。[方法] 2021年3月—2021年7月, 75例NONFH患者以及67例正常人纳入本研究。采用酶联免疫吸附法检测血清Bax、Bcl-2水平, 计算Bax/Bcl-2值。患者按不同因素分组比较Bax/Bcl-2的差异性。血清检测结果同临床病例资料行相关性分析。Bax/Bcl-2检测结果与是否股骨头坏死行ROC曲线分析。[结果] 坏死组患者血清Bax和Bax/Bcl-2显著高于正常组 ( $P<0.05$ )。激素、酒精和特发性股骨头坏死间Bax、Bax/Bcl-2水平差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 双侧坏死的病例Bax/Bcl-2显著高于单侧坏死病例 ( $P<0.05$ ); 塌陷组Bax、Bax/Bcl-2显著高于未塌陷组 ( $P<0.05$ )。随着ARCO分期等级越高, 血清Bax、Bax/Bcl-2显著升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。相关分析表明: 坏死组患者血清Bax和Bax/Bcl-2与ARCO分期呈显著正相关 ( $P<0.05$ ); 血清Bax和Bax/Bcl-2水平与VAS评分呈正相关, 与Harris评分呈负相关 ( $P<0.05$ )。ROC曲线分析, Bax/Bcl-2用于诊断NONFH的曲线下面积 (area under curve, AUC) 值为0.844。[结论] 血清Bax/Bcl-2水平与NONFH的病情严重程度相关, 其水平变化或可作为临床判断NONFH的潜在指标。

**关键词:** 非创伤性股骨头坏死, 血清标志物, B淋巴细胞瘤蛋白-2 (Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白质 (Bax)

**中图分类号:** R681.8      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1005-8478 (2023) 01-0010-05

**Significance of serum Bax/Bcl-2 in non-traumatic osteonecrosis of femoral head** // JI Feng-xuan<sup>1,2</sup>, LI Guo-peng<sup>3</sup>, ZHANG Wei-min<sup>4</sup>, WEI Biao-fang<sup>2</sup>. 1. Jinzhou Medical University, Jinzhou, 121000, China; 2. Department of Femoral Head, People's Hospital of Linyi City, Linyi, 276000, China; 3. Weifang Medical University, Weifang 261000, China; 4. Binzhou Medical University, Yantai, 264000, China

**Abstract:** [Objective] To explore the significance of serum Bax/Bcl-2 expression in non-traumatic osteonecrosis of the femoral head (NONFH). [Methods] A total of 75 patients with NONFH and 67 healthy subjects were included in the study from March 2021 to July 2021. The serum Bax/Bcl-2 were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The data were compared between the NONFH patients and normal subjects. In addition, the patients were divided into different groups according to different factors, and the Bax/Bcl-2 levels were compared among different groups. The correlation between the serum assays and clinical data was searched, and ROC curve analysis was performed on Bax/Bcl-2 and whether osteonecrosis of the femoral head happened. [Results] The NONFH patients had significantly higher serum Bax and Bax/Bcl-2 than the normal controls [ $(2.8\pm 1.9)$  vs  $(1.4\pm 0.7)$ ,  $P<0.05$ ]. Of the NONFH patients, there was no significant difference in Bax/Bcl-2 among different etiological subgroups ( $P>0.05$ ), however, the bilateral affected had significantly higher Bax/Bcl-2 than the unilateral affected ( $P<0.05$ ), the patients with femoral head collapsed had significantly higher Bax and Bax/Bcl-2 than those without femoral head collapsed ( $P<0.05$ ). As ARCO classification progressed, the Bax and Bax/Bcl-2 upgraded significantly ( $P<0.05$ ). In terms of correlations, the levels of Bax and Bax/Bcl-2 was positively correlated with ARCO stage and VAS score ( $P<0.05$ ), whereas negatively correlated with Harris score ( $P<0.05$ ). Furthermore, the ROC curve analysis showed that the area under the curve (AUC) of Bax/Bcl-2 for the predication of NONFH was 0.844. [Conclusion] The level of serum Bax/Bcl-2 is related to the severity of NONFH, and may be used as a potential index for clinical judgment of NONFH.

**Key words:** non-traumatic osteonecrosis of the femoral head, serum markers, B-cell lymphoma protein 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X (Bax)

DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2023.01.02

<sup>△</sup>基金项目: 山东省科技攻关计划项目 (编号: 2014GSF119022); 临沂市科技发展计划项目 (编号: 201717097)

作者简介: 纪沅轩, 在读硕士研究生, 研究方向: 股骨头坏死的临床研究, (电话) 13154546013, (电子信箱) 823464364@qq.com

\* 通信作者: 韦标方, (电话) 13969900661, (电子信箱) weibiaofang@163.com

股骨头坏死 (osteonecrosis of the femoral head, ONFH) 是具有高致残率的骨科疾病, 由于多因素致使股骨头血供受损或中断、血液循环受阻, 继而因头内缺血、缺氧发生部分组织坏死<sup>[1]</sup>。ONFH的病因很多, 总体上可分为创伤性股骨头坏死 (traumatic osteonecrosis of the femoral head, TONFH) 和非创伤性股骨头坏死 (non-traumatic osteonecrosis of the femoral head, NONFH), 而酒精、激素、系统性红斑狼疮等因素是NONFH的常见诱因。股骨头早期自身修复不完善致使股骨头的局部结构发生一定的改变, 后期会出现股骨头坏死区局部塌陷, 软骨破坏最终发展为髋关节功能障碍<sup>[2-4]</sup>。然而NONFH病理尚不明确, 早期诊断困难。因此临床对评估NONFH病情严重程度仍面临巨大挑战。

B淋巴细胞瘤蛋白-2 (B-cell lymphoma protein 2, Bcl-2) 和BCL2-相关X蛋白质 (Bcl-2-associated X, Bax) 是生物标志的研究热点之一。其中, Bax是Bcl-2基因家族的促凋亡成员, 它编码一种名为BAX-alpha的21-kDa蛋白质。研究人员认为BAX-alpha与Bcl-2的关联在调节内源性凋亡中起着关键作用<sup>[5]</sup>。Bcl-2是第一个显示易患癌症的癌基因, 是通过克隆与人类滤泡性淋巴瘤有关的t(14; 18)染色体易位而发现的。它们在细胞死亡, 淋巴瘤的发生、发展以及化疗反应中起重要作用已被证实。抗凋亡Bcl-2家族蛋白不仅通过凋亡防止细胞死亡, 而且还允许衰老细胞存活<sup>[6, 7]</sup>。在国内外相关Bax、Bcl-2的报道中, 其在肿瘤的生长过程中起着极大的作用, 但其能否在股骨头坏死的发生发展过程中存在一定的价值, 鲜有报道。本研究治疗NONFH中使用血清Bax/Bcl-2对该疾病的病情进行评估, 取得较满意效果, 现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 纳入与排除标准

纳入标准: (1) 通过病史、体格检查和髋部的X线、MRI扫描符合《中国成人股骨头坏死临床诊疗指南》(2020年); (2) 股骨头坏死按国际骨循环协会 (ARCO) 分期II~IV期; (3) 致病原因为酒精性、激素性、特发性。且均为单因素致病; (4) 年龄18~60岁。

排除标准: (1) 既往患有严重基础性疾病; (2) 合并高血脂血症、心脑血管疾病、肾功能异常等慢性基础疾病; (3) 患有代谢性骨病或近期服用过对骨代谢有影响的药物; (4) 正在行激素治疗和器官移植;

(5) 髋关节或膝关节骨关节炎及其他关节病变。

### 1.2 一般资料

回顾性分析2021年3月—2021年7月就诊于临沂市人民医院股骨头专科NONFH患者的临床资料, 共75例符合上述标准, 纳入本研究, 设为坏死组。此外, 选择同时期健康查体的67例正常人作为正常人组, 其性别、年龄与坏死组相匹配。本研究获临沂市人民医院伦理委员会的批准, 所有研究对象均签署知情同意书。

### 1.3 血清Bax、Bcl-2水平检测

所有受试者, 包括股骨头坏死者和正常人, 隔夜禁食后采集静脉血约5 ml, 置于不含肝素的真空采血管, 4℃, 3 000 r/min离心10 min分离血清。将离心后所得上清液放置于-80℃冰箱保存备用直到检测。采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (武汉华美) 检测血清Bax及Bcl-2浓度水平, 试剂盒均批内差<8%, 批内差<10%。实验步骤严格按照制造商的使用说明书进行。计算Bax/Bcl-2值。

### 1.4 评价指标

记录两组一般资料, 包括性别、年龄、身高、体重、体重指数 (body mass index, BMI)、病因及坏死侧别。采用疼痛视觉模拟评分 (visual analogue scale, VAS)、Harris评分评价髋关节疼痛及功能情况。行影像学检查, 行双侧股骨头ARCO分期评估, 双侧NONFH患者ARCO分期取严重侧分级, ARCO分期Ⅲ期及以上为股骨头塌陷。

### 1.5 统计学方法

采用SPSS 24.0软件进行统计分析, GraphPad Prism 9.0作图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 资料呈正态分布时, 组间比较采用独立样本t检验; 资料呈非正态分布时, 采用非参数检验。计数资料采用 $\chi^2$ 检验或Fisher精确检验。等级资料采用秩和检验。血清指标与临床指标之间行Pearson或Spearman相关分析, 血清指标与是否为NONFH行ROC曲线分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 坏死组与正常人组资料比较

坏死组与正常人组资料比较见表1, 两组年龄、性别、体重指数的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。坏死组的血清Bax浓度、Bax/Bcl-2显著高于正常人组 ( $P < 0.05$ ), 两组Bcl-2浓度的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 两组一般资料与比较

指标	坏死组 (n=75)	正常人组 (n=67)	P 值
年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$ )	50.3±8.8	48.6±7.5	0.663
性别 (例, 男/女)	54/21	46/21	0.940
BMI (kg/m <sup>2</sup> , $\bar{x} \pm s$ )	25.0±3.4	24.8±4.6	0.798
Bax (ng/ml, $\bar{x} \pm s$ )	3.8±1.7	2.1±0.8	<0.001
Bcl-2 (ng/ml, $\bar{x} \pm s$ )	1.7±1.1	1.7±0.8	0.832
Bax/Bcl-2 ( $\bar{x} \pm s$ )	2.8±1.9	1.4±0.7	<0.001

## 2.2 坏死组分层血清检验指标比较

75 例 NONFH 患者不同指标分类血清 Bax、Bcl-

2 及 Bax/Bcl-2 水平比较结果见表 2。可见不同致病因素, 包括激素、酒精和特发性股骨头坏死间 Bax/Bcl-2 水平差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。按照坏死侧别分类, 双侧坏死的病例 Bax/Bcl-2 水平显著高于单侧坏死病例 ( $P<0.05$ )。单侧和双侧 Bax、Bcl-2 水平的差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。按照影像学分类, 塌陷组 Bax、Bax/Bcl-2 水平显著高于未塌陷组 ( $P<0.05$ ), 但 Bcl-2 水平差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。ARCO 分期等级越高, 血清 Bax、Bax/Bcl-2 浓度值越高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 但 Bcl-2 浓度无显著变化 ( $P>0.05$ )。

表 2 75 例 NONFH 患者不同指标分组血清检验结果 ( $\bar{x} \pm s$ ) 与比较

指标	分层指标	Bax (ng/ml)	Bcl-2 (ng/ml)	Bax/Bcl-2
病因	酒精性 (n=35)	3.6±1.6	1.7±1.1	2.4±0.9
	激素性 (n=18)	4.0±2.0	1.7±1.5	3.2±3.6
	特发性 (n=22)	3.8±1.8	1.5±0.6	2.6±0.4
	P 值	0.762	0.762	0.253
侧数	单侧 (n=38)	3.2±1.4	1.7±1.4	2.3±0.8
	双侧 (n=37)	4.3±1.9	1.6±0.8	2.8±0.8
	P 值	0.060	0.581	<0.001
塌陷程度	塌陷 (n=56)	4.2±1.8	1.6±1.2	3.1±1.1
	未塌陷 (n=19)	2.4±0.6	1.9±0.5	1.4±0.7
	P 值	<0.001	0.207	<0.001
ARCO 分期	II (n=19)	2.4±0.6	1.9±0.5	1.4±0.7
	III (n=26)	3.2±1.1	1.6±1.3	2.3±0.6
	IV (n=30)	5.1±1.8	1.1±2.0	3.8±1.0
	P 值	<0.001	0.399	<0.001

## 2.3 临床与检测指标的相关分析

临床指标与坏死组血清 Bax、Bcl-2 浓度及 Bax/Bcl-2 比值相关性见表 3。Spearman 相关分析表明: 坏死组患者血清 Bax、Bax/Bcl-2 与 ARCO 分期呈显著正相关 ( $P<0.05$ ), 随 ARCO 分期加重, 血清 Bax/Bcl-2 浓度水平呈上升趋势 (图 1a, 1b)。经 Pearson 分析表明血清 Bax 浓度、Bax/Bcl-2 水平与 VAS 评分呈显著正相关 (图 1c, 1d), 与 Harris 评分呈显著负相关 ( $P<0.05$ ) (图 1e, 1f)。

## 2.4 是否坏死与检验指标的 ROC 曲线分析

对 75 例坏死组患者与 67 例正常人组血清 Bax、Bcl-2 以及 Bax/Bcl-2 比值 ROC 曲线分析结果见表 4 及图 2。患者血清 Bax 浓度诊断 NONFH 的 AUC 为 0.839 (95% CI=0.774~0.903,  $P<0.05$ )。Bax/Bcl-2 比值用于诊断 NONFH 的 AUC 为 0.844 (95% CI=0.775~0.914,  $P<0.05$ )。而 Bcl-2 AUC=0.548 且

$P>0.05$  无统计学意义。表明血清 Bax 水平和 Bax/Bcl-2 比值在诊断 NONFH 时具有一定的敏感性和特异性, 可能成为 NONFH 诊断的潜在血清标记物。

表 3 临床与检测指标的相关分析

指标	ARCO 分期	VAS 评分	Harris 评分
Bax			
r 值	0.759	0.489	-0.446
P 值	<0.001	<0.001	<0.001
Bcl-2			
r 值	-0.359	0.030	0.083
P 值	0.002	0.801	0.481
Bax/Bcl-2			
r 值	0.798	0.491	-0.586
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

表 4 血清指标判断是否股骨头坏死的 ROC 分析结果

指标	最佳临界值	敏感性	1-特异性	AUC	95% CI
Bax	2.609	0.773	0.254	0.839	0.774~0.903
Bcl-2	1.444	0.701	0.533	0.548	0.453~0.643
Bax/Bcl-2	1.736	0.800	0.104	0.844	0.775~0.914

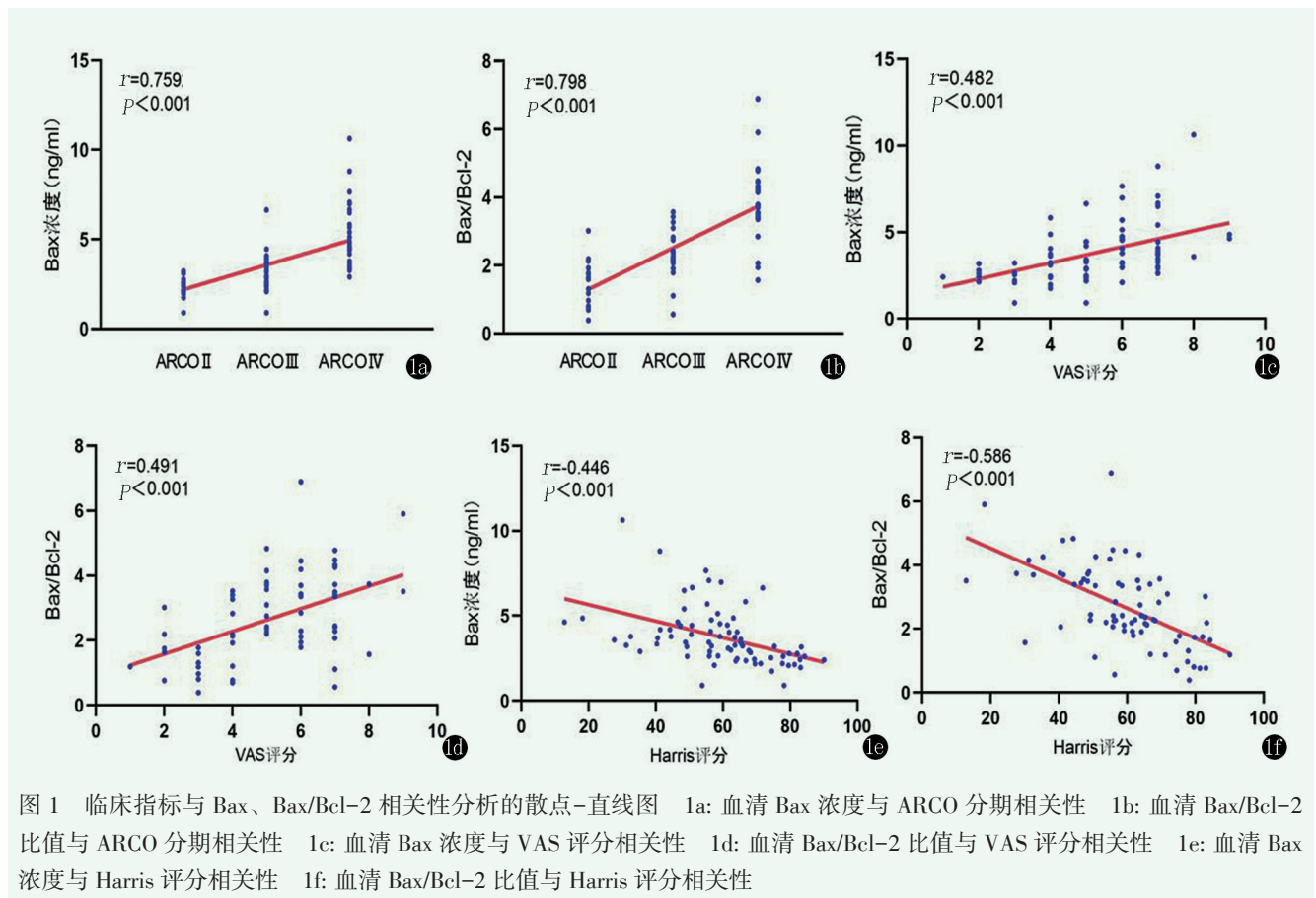


图 1 临床指标与 Bax、Bax/Bcl-2 相关性分析的散点-直线图 1a: 血清 Bax 浓度与 ARCO 分期相关性 1b: 血清 Bax/Bcl-2 比值与 ARCO 分期相关性 1c: 血清 Bax 浓度与 VAS 评分相关性 1d: 血清 Bax/Bcl-2 比值与 VAS 评分相关性 1e: 血清 Bax 浓度与 Harris 评分相关性 1f: 血清 Bax/Bcl-2 比值与 Harris 评分相关性

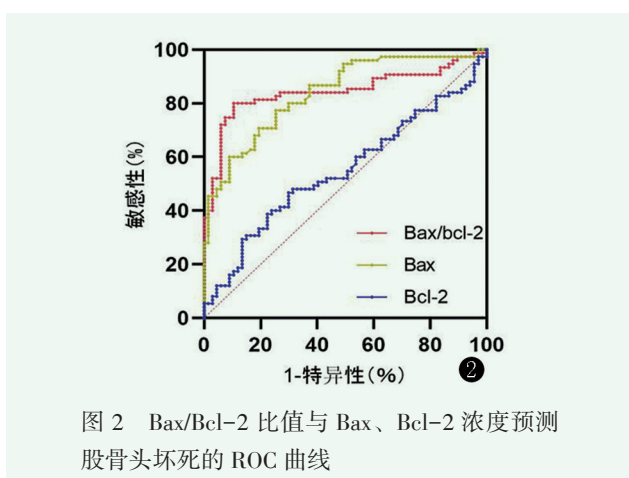


图 2 Bax/Bcl-2 比值与 Bax、Bcl-2 浓度预测股骨头坏死的 ROC 曲线

### 3 讨论

近年来, 随着对股骨头坏死的研究不断深入, 股骨头坏死血清生物标志物的报道受到广泛关注。相关

研究显示, 血清标志物在早期诊断 NONFH 中可能发挥作用<sup>[8, 9]</sup>。Jin<sup>[10]</sup> 研究发现 NONFH 患者血清 Ln-cRNA MALAT1 表达显著低于健康正常人组且坏死组织中的局部 MALAT1 表达在受影响区域明显低于非受影响区域。曹婷<sup>[11]</sup> 对比 NONFH 患者组和同期健康人组血清中 OPN 和 Chemerin 浓度水平, 发现患者组的浓度水平显著高于健康人组。此外, 坏死组中血清 OPN 和 Chemerin 浓度与病程、VAS 评分、ARCO 及股骨头坏死塌陷程度呈现显著正相关, 而与 Harris 评分呈负相关。曾平等<sup>[12]</sup> 通过 nanoLC 联合 Orbitrap Elite 高通量蛋白质组学对创伤性股骨头坏死病例分析发现其中抗粘蛋白 1 轻链可变区、补体 C5、冷凝集蛋白 FS-2H 链等多种蛋白表达上调; Igλ 链 V 区 4A、多巴胺 β-羟化酶与免疫球蛋白重链可变区等多种蛋白表达下调。同样有学者发现在 NONFH 患者血清中血清瘦素、脂联素、抗酒石酸酸性磷酸酶与 II 型胶原 C 端肽都有不同程度的浓度变化<sup>[13]</sup>。

细胞凋亡是多因素共同调节的复杂过程。目前研究认为线粒体中的 Bcl-2 基因家族是细胞凋亡的重要调控基因, 抗凋亡基因 Bcl-2 家族成员生物学效应是调整细胞的存活期而不影响细胞增殖<sup>[14]</sup>。Klimentova 等<sup>[15]</sup> 研究发现, 在具有高回声(钙化) APs 的动脉壁中, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达减少, 促凋亡蛋白 Bax 的表达增加, 表明晚期动脉粥样硬化病变中的凋亡系统激活。有学者通过研究舌鳞状上皮细胞分析发现, 在血清饥饿处理的细胞中 Bcl-2/Bax 比值显著降低, 进一步表明血清饥饿诱导了细胞凋亡<sup>[16]</sup>。同样有研究证实, 与健康人相比, 脊髓损伤患者在 1、3、7 d 后血清 Bax 水平逐渐升高, Bcl-2 则降低<sup>[17]</sup>。Bax 与 Bcl-2 组成异二聚体, 而 Bax 自身组成同二聚体。Bax 与 Bcl-2 蛋白量的比率决定同二聚体和异二聚体的比值, 这对细胞凋亡易感性起关键作用<sup>[18]</sup>。

因此, 笔者推测, 在疾病进展中 Bax 蛋白在促进其演变过程起主要因素, 激活后与 Bcl-2 家族蛋白异二聚化, 并改变细胞线粒体以诱导细胞死亡, 造成稳态失衡, 从而促进凋亡过程的发生, 进而加重了股骨头坏死的病情发展。

本实验研究过程中存在问题: 纳入研究的临床病例资料较少可能难以代表整个 NONFH 患者的整体情况; 本实验只检测了抑制细胞凋亡作用的 Bcl-2 及促进细胞凋亡作用的 Bax 2 个代表性指标, 未能体现整个 Bcl-2 基因家族与 NONFH 的联系。今后应加大样本量, 并从不同地区医院收集标本, 增加实验研究的可信度和普遍性; 检测其他的 Bcl-2 家族蛋白指标, 并对 Bcl-2 基因家族与 NONFH 的相关性作更进一步的研究。

综上所述, 本研究实验表明, 血清 Bax/Bcl-2 比值对 NONFH 的病情严重程度判断存在一定价值, 其水平变化可作为临床评估 NONFH 发生的潜在血清指标, 为 NONFH 患者临床诊断提供实验依据。

#### 参考文献

[1] Zhao D, Zhang F, Wang B, et al. Guidelines for clinical diagnosis and treatment of osteonecrosis of the femoral head in adults (2019 version)[J]. *J Orthop Translat*, 2020, 21 : 100-110.  
[2] Hines JT, Jo WL, Cui Q, et al. Osteonecrosis of the femoral head: an updated review of ARCO on pathogenesis, staging and treat-

ment [J]. *J Kor Med Sci*, 2021, 36 (24) : e177.  
[3] 温家福, 韦标方. 激素性股骨头坏死骨髓间充质干细胞成骨分化的研究进展 [J]. *解放军医学杂志*, 2020, 45 (11) : 1207-1214.  
[4] Liu M, Zhao G, Wei BF. Attenuated serum vasoactive intestinal peptide concentrations are correlated with disease severity of non-traumatic osteonecrosis of femoral head [J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16 (1) : 325.  
[5] Carpenter R, Brady MF. BAX gene [M]. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2022.  
[6] Wei MC. Bcl-2-related genes in lymphoid neoplasia [J]. *Int J Hematol*, 2004, 80 (3) : 205-209.  
[7] Basu A. The interplay between apoptosis and cellular senescence: Bcl-2 family proteins as targets for cancer therapy [J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 230 : 107943.  
[8] 林清宇, 韦标方. 血清纤维蛋白原  $\alpha$  链在非创伤性股骨头坏死中的意义 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2020, 28 (23) : 2131-2134.  
[9] 李峰, 高军茂, 张瑒. 血清标志物与股骨头坏死骨密度和骨钙素的关系 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2022, 30 (9) : 858-860.  
[10] Jin Y, Zhu HX, Wei BF. Reduced serum and local lncRNA MALAT1 expressions are linked with disease severity in patients with non-traumatic osteonecrosis of the femoral head [J]. *Technol Health Care*, 2021, 29 (3) : 479-488.  
[11] 曹婷, 韦标方. 骨桥蛋白和趋化素评估非创伤性股骨头坏死的价值 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2021, 29 (20) : 1853-1857.  
[12] 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.  
[13] 何敏聪, 魏秋实, 何伟. 非创伤性股骨头坏死血清标志物临床应用的研究进展 [J]. *实用医学杂志*, 2017, 33 (1) : 154-156.  
[14] Hafezi S, Rahmani M. Targeting BCL-2 in cancer: advances, challenges, and perspectives [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13 (6) : 1292.  
[15] Klimentova EA, Suchkov IA, Shchulkin AV, et al. Expression of apoptotic markers Bcl-2 and Bax in the vascular wall [J]. *Sovrem Tekhnologii Med*, 2021, 13 (2) : 46-50.  
[16] Huang Y, Fu Z, Dong W, et al. Serum starvation-induced down-regulation of Bcl-2/Bax confers apoptosis in tongue coating-related cells in vitro [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17 (4) : 5057-5064.  
[17] 张子亮, 黄凯华, 吴晓曙, 等. 脊髓损伤患者血清神经营养因子、炎症因子及 Bcl-2/Bax 的表达 [J]. *临床检验杂志*, 2021, 39 (12) : 936-938.  
[18] Liu J, Liu W, Lu Y, et al. Piperlongumine restores the balance of autophagy and apoptosis by increasing BCL2 phosphorylation in rotenone-induced Parkinson disease models [J]. *Autophagy*, 2018, 14 (5) : 845-861.

(收稿:2022-04-02 修回:2022-09-27)  
(同行评议专家:袁普卫 冯志)  
(本文编辑:闫承杰)