

· 基础研究 ·

亚麻木酚素对大鼠生长板软骨细胞凋亡的影响

梁国辉, 谢艳, 郭云鹏, 邢伟鹏, 裴圆圆
(洛阳正骨医院 河南省骨科医院, 河南 洛阳 471000)

【摘要】 目的: 比较不同浓度亚麻木酚素抑制生长板软骨细胞凋亡的效果, 筛选出最适药物浓度, 为其延迟大鼠骨骺闭合促进长骨生长进行理论支持。方法: 选取 2 只 4 周龄雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体质量 80 g。解剖大鼠胫骨及股骨生长板软骨并进行体外分离, 获得生长板软骨细胞进行培养, 利用倒置相差显微镜及 II 型胶原免疫荧光实验对软骨细胞分别进行形态学观察、鉴定, 然后采用白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 20 ng/ml 诱发生长板软骨细胞凋亡为模型组, 同时加入分别含 1、10、20、40 μ M 亚麻木酚素为实验组, 同时加入 5 μ M 来曲唑为阳性对照组, 分别培养 24、48 h, MTT 法观察药物促进细胞增殖情况, 流式细胞仪检测药物抑制细胞凋亡情况。结果: 含量 1、10、20、40 μ M 的亚麻木酚素均可不同程度促进细胞增殖, 其原理为药物抑制了 IL-1 β 诱发的生长板软骨细胞凋亡, 抑制细胞凋亡的最佳药物浓度为 20 μ M。结论: 适宜浓度的亚麻木酚素对大鼠生长板软骨细胞凋亡抑制效果明显且最适药物浓度为 20 μ M, 为骨骼延迟闭合提供更长的生长时间, 从而为促进发育期骨骼增长提供可能。

【关键词】 亚麻木酚素; 软骨细胞; 细胞凋亡; 细胞抑制; 骨骺闭合

中图分类号: R965.1

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2022.11.015

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effect of Flax lignans on apoptosis of growth plate chondrocytes in rats LIANG Guo-hui, XIE Yan, GUO Yun-peng, XING Wei-peng, and PEI Yuan-yuan. Henan Provincial Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital, Henan Provincial Orthopedic Hospital, Luoyang 471000, Henan, China

ABSTRACT **Objective:** To compare the effects of different concentrations of linolenin on inhibiting apoptosis of chondrocytes in the growth plate, and to screen the optimal concentration of linolenin, so as to provide theoretical support for delaying epiphyseal closure and promoting long bone growth in rats. **Methods:** Two 4-week-old male SD rats (SPF grade) with a body mass of 80 g were selected. The growth plate cartilage of rat tibia and femur was dissected and isolated in vitro to obtain growth plate chondrocytes for culture. The chondrocytes were observed and identified by inverted phase contrast microscope and type II collagen immunofluorescence test, and then 20 ng/ml IL-1 β was used to induce apoptosis of growth plate chondrocytes as model group, and added with 1, 10, 20, 40 μ M linolenin as the experimental group, and 5 μ M letrozole as the positive control group. The cells were cultured for 24 and 48 hours respectively. The drug promoted cell proliferation was observed by MTT method, and the drug inhibited cell apoptosis was detected by flow cytometry. **Results:** Contents 1, 10, 20, 40 μ M could promote cell proliferation in varying degrees, and the principle was that the drug inhibits IL-1 β induced chondrocyte apoptosis in the growth plate, and the optimal concentration of drugs to inhibit apoptosis was 20 μ M. **Conclusion:** The appropriate concentration of linseed lignans can significantly inhibit the apoptosis of chondrocytes in the growth plate of rats, and the optimal drug concentration is 20 μ M. It provides possibility for delayed bone closure and longer growth time to promote bone growth during development.

KEYWORDS Flax lignans; Chondrocytes; Apoptosis; Cell inhibition; Epiphyseal closure

亚麻木酚素又名开环异落叶松酚二葡萄糖苷, 主要存在于亚麻籽中, 含量主要取决于亚麻品种、生态条件及气候^[1-2], 其具有雌激素效应, 有抗癌和预防糖尿病等作用^[3-5]。药效研究成为天然产物研究中的焦点之一, 对雌激素依赖性疾病, 如乳腺癌、经期

综合征、前列腺癌、骨质疏松等有预防作用^[6]。芳香化酶抑制剂通过抑制芳香化酶活性可有效降低雌激素水平, 由于芳香化反应是类固醇激素生物合成过程中独特的反应, 而且雌激素是这种反应的最终产物, 所以芳香化酶抑制所致的雌激素减少不会影响其他类固醇激素的产生, 这正是芳香化酶抑制剂可能应用于临床之所在。近年来逐渐用于治疗了青春期峰速生长的矮身材青少年^[7-10], 然而, 芳香化酶抑制剂药品说明书并无儿童用药适应证, 且临床研究发现芳香化酶抑制剂常见的不良反应有钙流失、

基金项目: 河南省中医药科学研究专项课题(编号: 2018ZY1023)

Fund program: Special Project for Scientific Research of Traditional Chinese Medicine in Henan Province (No.2018ZY1023)

通讯作者: 谢艳 E-mail: xieyan1666@126.com

Corresponding author: XIE Yan E-mail: xieyan1666@126.com

骨质疏松,严重者可发生骨折、关节痛,肌肉、血脂异常,增加心血管系统的风险,尤其是对骨代谢的远期影响尚不清楚,而且其机制尚未阐明。笔者的前期实验发现其促进青少年骨骼生长可能与生长板软骨细胞凋亡有关。但是大多数芳香化酶抑制剂抑制生长板软骨细胞凋亡的药物浓度也没有明确的报道。亚麻木酚素作为天然的芳香化酶抑制剂的一种^[11],可以提高骨质疏松大鼠血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)活性,并可提高最大载荷(Pmax)、最大挠度(Lmax)、最大弯矩(Mmax)和骨应变,在低浓度时能增进成骨细胞活性,高浓度时抑制其活性,对骨质疏松有一定的对抗作用,成为治疗骨质疏松的新疗法。亚麻木酚素在结构和功能上与甾体类激素相似,具有弱雌激素活性作用,可以抑制雌激素合成而延缓骨龄进程,更好地改善成年终身高。并且做为天然产物,其毒副作用相对较小。基于此,本研究 2020 年 4 月至 9 月期间观察了不同浓度亚麻木酚素抑制生长板软骨细胞凋亡的效果,并筛选出最佳药物浓度,为其具有确切的抑制生长板软骨细胞凋亡的作用提供有力的实验支持。

1 资料与方法

1.1 实验试剂与仪器

胶原蛋白酶 II (Gibco, 货号:17101015), DMEM/F12 培养基(iCell, 货号:iCell-0005), 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, iCell, 货号:iCell 0500), 台盼蓝染色液(0.4%, Solarbio, 货号:C0040), 0.25%胰蛋白酶(含 0.02% EDTA, Gibco, 货号:25200-072), 白细胞介素-1 β (CTESTINGBIO, 货号:CS38907H), 来曲唑(CTESTINGBIO, 货号:112809-51-5), 亚麻木酚素(Zstandard, 货号:158932-33-3), 四甲基偶氮唑蓝(MTT, 碧云天, 货号:ST316), 曲拉通(Solarbio, 货号:T8200-500ml), 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)溶液(Solarbio, 货号:C0065), 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO, Sigma 公司, 货号:D2650-100ML), 封闭山羊血清(Solarbio, 货号:SL038), 荧光封片剂(Fluoromount-G, Thermo Fisher Scientific 公司, 货号:00-4958-02), 抗 II 型胶原蛋白抗体(Collagen type II Antibody, Proteintech 公司, 货号:15943-1-AP), AN-NEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(Solarbio, 货号:CA1020)。37 °C 恒温细胞培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂, 规格型号:BC-J160S), 细胞培养孔板(上海卧宏生物科技有限公司, 型号 WHB-24), 恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司, 型号:DK-600S), 电子天平(上海天美天平仪器有限公司, 型号:JA2603B), 立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯, 型号:YXQ-LS-50811), 高速离心机(Thermo Fisher, 货

号:75004250), 电热恒温震荡水槽(上海精宏实验设备有限公司, 型号:DK-2B), 多功能酶标仪(Labsystems Multiskan MS, 芬兰, 352 型), 高级分析倒置显微镜(Nikon, 型号:DS-Ri2), 血球计数板(Marienfeld, 型号:Neubauer improved), 德国 Miltenyi MAC-SQuant Analyzer 流式细胞仪(Miltenyi, 型号:130-092-197)。

1.2 动物及药物制备

2 只 4 周龄雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体质量 80 g, 购于河南省实验动物中心, 动物合格证号:2017-0001。来曲唑、亚麻木酚素(纯度 \geq 亚麻木)标准品, 用适量溶媒(细胞级 DMSO)使其完全溶解, 用含 10% FBS 的 DMEM/F12 完全培养基调至终浓度为 10 mg/ml, 使用 0.22 μ m 细胞过滤器过滤除菌, 4 °C 冰箱保存备用, 使用时用含 10% FBS 的 DMEM/F12 完全培养基稀释至所需浓度。白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)溶液用无菌 PBS 缓冲液溶解, 用含 10% FBS 的 DMEM/F12 完全培养基调至终浓度为 20 ng/ml 备用。

1.3 实验药物干预与分组情况

首先检测亚麻木酚素对正常生长板软骨细胞凋亡的影响, 本实验分组为正常对照组(加入含 10% FBS 的 DMEM/F12 完全培养基), DMSO 组(每孔 20 μ l), 模型对照组(IL-1 β 20 ng/ml), 阳性对照组(IL-1 β 20 ng/ml+来曲唑 5 μ M), 非造模组(只加入亚麻木酚素 20 μ M, 不诱导细胞凋亡), 亚麻木酚素不同浓度实验组(每孔加入 20 ng/ml IL-1 β 的同时分别加入浓度为 1、10、20、40 μ M 的亚麻木酚素), 每组设 6 个复孔(实验重复 3 次), 以筛选出最佳药物浓度。通过 IL-1 β 诱导软骨细胞凋亡构建细胞模型, 根据筛选的最适剂量检测亚麻木酚素抑制软骨细胞凋亡的作用。实验分组为正常对照组、模型对照组、阳性对照组、亚麻木酚素组(20 μ M)。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 大鼠生长板软骨细胞分离培养及鉴定^[18]

用 3% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行腹腔麻醉, 然后脱颈椎处死, 置于 75% 乙醇中浸泡 5 min。置于超净工作室内分离四肢, 去除皮肤和肌肉组织。剪下胫骨近端生长板软骨, 冲洗、充分剪碎, 加入 1% II 型胶原酶 2 ml, 37 °C 水浴锅振荡 5 h, 然后用 200 目不锈钢滤网过滤, 滤液 1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞沉淀, 用 PBS 清洗 2 次。用 DMEM/F12 完全培养基(含 10% 的胎牛血清, pH 7.2)反复吹打混匀, 制成细胞悬液。血球计数板计数, 用台盼蓝染色测定细胞活力。将细胞悬液以 1×10^5 /ml 浓度接种到装有含 10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养液的 T25 培养瓶中, 置于

37 ℃、含 5% (体积百分数) 的 CO₂ 培养箱中培养。每天在倒置显微镜下观察细胞生长情况, 每 2 d 换液 1 次, 在细胞接近 80%~90% 汇合时进行传代。

取传代细胞爬片于 24 孔板中, 每孔加入 DMED/F12 培养基 1 ml, 加入细胞 1×10⁴ 个/孔, 置于培养箱中过夜培养。细胞爬片后, 吸出培养基, 用 PBS 洗 1 遍, 加入 1 ml 4% PFA (可溶性聚四氟乙烯) 于 4 ℃ 固定 30 min, 以 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 最后一次不吸出 PBS, 于 4 ℃ 过夜。将玻片干燥, 置于玻片支撑物上, 用玻璃片封闭液封闭 (0.5% Triton X-100 与 PBS 1:1 混合, 再加 10% 山羊血清, 取 50 μl 破膜封闭液滴于防水膜上, 在玻片上有细胞的一面盖上 2 h), 然后取 50 μl 兔 II 型胶原一抗工作液 (PBS 配置, 一抗: PBS=1:100, 购于 Proteintech 公司) 孵育液于防水膜上 (湿盒中), 在一抗孵育液上盖上阳性玻片有细胞的一面, 放于 4 ℃ 过夜, 阴性玻片不孵育一抗。避光孵育 Alexa Fluor 594 标记的山羊抗兔 IgG (H+L) 荧光二抗工作液 (PBS 配置, 二抗: PBS=1:500, 购于 Proteintech 公司) 2 h 后, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 染 DAPI 5 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。玻片上各滴 1 滴 Fluoromount-G, 将有细胞的一面盖上, 进行细胞鉴定。

1.4.2 MTT 法初步观察亚麻木酚素对生长板软骨细胞凋亡的作用 取对数期生长的大鼠生长板软骨细胞消化处理后, 按 1×10⁴ 个/孔接种于 96 孔板, 放于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱, 按照实验分组检测正常对照组、DMSO 组、模型对照组、阳性对照组、非造模组、亚麻木酚素不同浓度实验组生长板软骨细胞增殖情况。每孔总体积 200 μl, 每组设 6 个复孔 (重复 3 次), 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱分别培养 24、48 h 后, 取出 96 孔板, 将 20 μl MTT (5 mg/ml) 溶液加入至每个培养孔中, 继续培养 4 h 后, 取出 96 孔板, 吸除培养基, 每孔加 150 μl Formazan 溶液, 置摇床上低速振荡 30 min, 使结晶物充分溶解, 用酶标仪在 OD 570 nm 处测量各孔的吸光值。每组 OD 值/正常对照组 OD 值为细胞存活率。

1.4.3 流式细胞仪观察亚麻木酚素对 IL-1β 引起细胞凋亡的抑制作用 培养的对数期生长板软骨细胞, 分为正常对照组、模型对照组、阳性对照组和亚麻木酚素组 (以上述方法加入各种药物, 亚麻木酚素组加入 1.3 节中筛选的最适药物浓度) 培养 48 h。先用胰酶消化, 再用 PBS 洗涤 1 次, 用 1 ml Binding Buffer 悬浮细胞, 300 g 离心 10 min, 弃上清液, 然后用 1 ml Binding Buffer 重悬细胞, 使细胞的密度达到 1×10⁶ 个/ml, 每管加入 100 μl 细胞 (1×10⁵ 个), 再于管内加入 5 μl Annexin V-FITC, 室温, 避光, 轻轻混

匀, 10 min, 加入 5 μl 碘化丙啶, 室温、避光, 孵育 5 min, 加入 PBS 至 500 μl, 轻轻混匀, 在 1 h 内用流式细胞仪检测。观察细胞凋亡情况并记录细胞凋亡率。

1.5 统计学处理

以 EXCEL 软件录入数据, 应用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。对不同浓度的亚麻木酚素对生长板软骨细胞的凋亡影响和不同组别药物对生长板软骨细胞凋亡率等定量资料均以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析方法进行数据分析, 组间差异行 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨细胞形态及免疫荧光观察

软骨细胞在刚接种时为小圆球形, 悬浮在培养液中, 细胞体积大小相似, 折光性较强。随着培养, 软骨细胞逐渐增大, 胞核与核仁逐渐清晰, 经过 2 d 培养, 细胞开始逐渐贴壁, 形态多呈圆形或椭圆形增大, 伸长形成伪足 (图 1a)。培养 4 d 后软骨细胞呈扁平状、不规则卵圆形或三角形, 有成簇及重叠生长现象出现 (图 1b)。培养 6 d 后 90% 软骨细胞融合成单层, 细胞形态不规则, 呈多边形、星形等, 胞体丰富、胞浆均匀, 相互密集连接呈“铺路石”状外观 (图 1c)。3 代后细胞大多为长梭形, 遮光性差, 部分细胞由贴壁状态脱落, 悬浮于培养液中 (图 1d)。软骨细胞免疫荧光鉴定结果软骨细胞分泌的 II 型胶原是特异性胶原, 可利用 II 型胶原免疫荧光对软骨细胞进行鉴定, 大鼠生长板软骨细胞经培养 72 h 后进行免疫荧光实验。结果显示, 在荧光倒置相差显微镜下, 细胞核经 DAPI 染色后在不同波段荧光激发出蓝色荧光 (图 2a), 细胞质被激发出清晰红色荧光 (图 2b), 表明分离培养的细胞表达出特征性 II 型胶原, 符合软骨细胞的生物学特征, 证明该实验方法可以分离培养出纯度较高的软骨细胞 (图 2c), 以供进一步实验研究使用。

2.2 亚麻木酚素抑制生长板软骨细胞凋亡的药物浓度初步筛选

培养 24 h 的 1、10、20、40 μM 的亚麻木酚素对生长板软骨细胞均有增殖作用, 与模型对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 最佳的药物浓度为 20 μM (细胞存活率为 111.67%); 培养 48 h 的 1、10、20、40 μM 亚麻木酚素对生长板软骨细胞均有增殖作用, 与模型对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 增殖作用均比阳性对照组好 ($P < 0.01$), 且最佳药物浓度为 20 μM (细胞存活率为 115.28%); DMSO 组与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 只加亚麻木酚素 20 μM 组 (非造模组) 与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。结果说

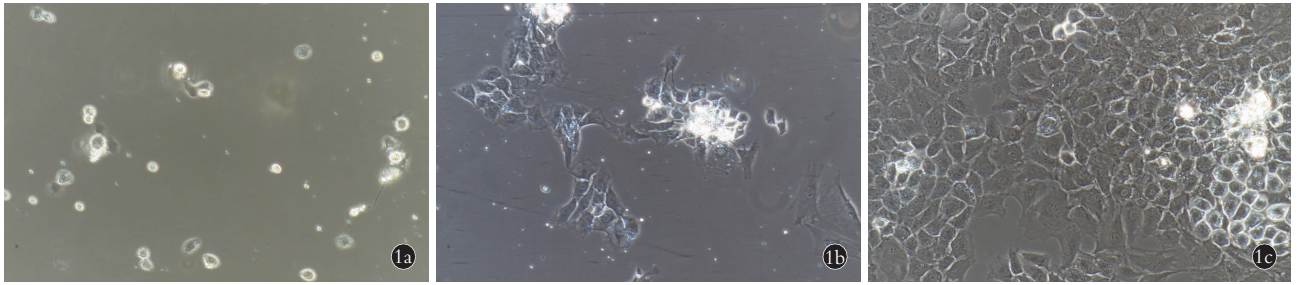


图 1 生长板软骨细胞形态变化(200×) 1a. 生长板软骨细胞培养 2 d 1b. 生长板软骨细胞培养 4 d 1c. 生长板软骨细胞培养 6 d 1d. 生长板软骨细胞培养 3 代

Fig.1 Morphological changes of growth plate chondrocytes(200×) 1a. Growth plate chondrocytes cultured for 2 d 1b. Growth plate chondrocytes cultured for 4 d 1c. Growth plate chondrocytes cultured for 6 d 1d. Growth plate chondrocytes cultured for 3 passages

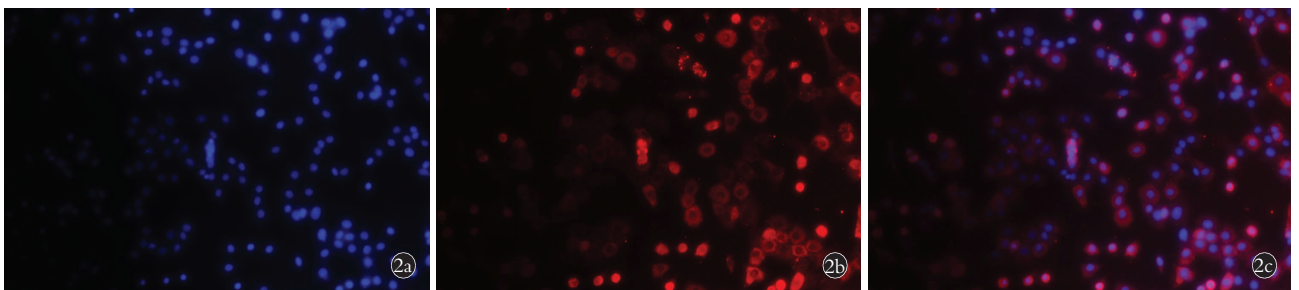
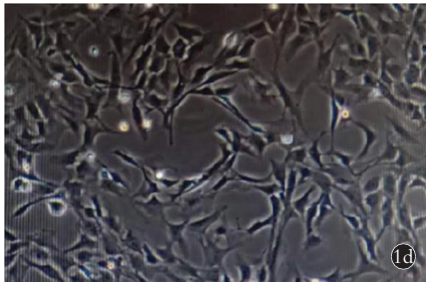


图 2 生长板软骨细胞免疫荧光鉴定(×200) 2a. 染色后的细胞核 2b. 染色后的细胞质 2c. 染色后的细胞

Fig.2 Immunofluorescence identification of growth plate chondrocytes(200×) 2a. Stained nuclei 2b. Stained cytoplasm 2c. Stained cells

表 1 培养 24 h 和 48 h 后亚麻木酚素抑制生长板软骨细胞凋亡的浓度筛选

Tab.1 Different concentration of flax lignans inhibiting the apoptosis of growth plate chondrocytes after 24 and 48 hours

组别	孔数	亚麻木酚素 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{M}$)	MTT 实验细胞 OD 值		细胞活率(100%)	
			培养 24 h	培养 48 h	培养 24 h	培养 48 h
正常对照组	6	0	0.663±0.021	0.665±0.019	100.00	100.00
DMSO 组	6	0	0.655±0.045	0.658±0.008	98.82	98.98
模型对照组	6	0	0.442±0.031 ^a	0.435±0.026 ^b	66.67	65.44
阳性对照组	6	0	0.641±0.025 ^{ac}	0.651±0.028 ^{bc}	96.71	94.62
非造模组	6	20	0.686±0.030 ^{cc}	0.668±0.042 ^c	104.77	100.47
亚麻木酚素 实验 1 组	6	1	0.662±0.025 ^c	0.697±0.018 ^{cc}	99.92	104.75
不同浓度组 实验 2 组	6	10	0.681±0.020 ^{acd}	0.756±0.028 ^{bcc}	102.71	113.61
实验 3 组	6	20	0.740±0.015 ^{acc}	0.767±0.031 ^{bcc}	111.67	115.28
实验 4 组	6	40	0.711±0.009 ^{acc}	0.691±0.026 ^{cde}	107.27	103.85
F 值			62.420	83.719		
P 值			0.000	0.000		

注:实验 1-4 组分别加入 1, 10, 20, 40 μM 浓度亚麻木酚素。与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^a $P < 0.01$

Note: Group 1-4 were added with flax lignans at concentration 1, 10, 20, 40 μM . Compared with the normal control group, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; Compared with the model group, ^a $P < 0.01$; Compared with the positive control group, ^a $P < 0.05$, ^a $P < 0.01$

明,溶剂对细胞增殖无影响,亚麻木酚素并不引起细胞增殖,其在亚麻木酚素不同浓度组产生细胞较模型组增殖的现象是由于其抑制细胞凋亡引起的。

2.3 流式细胞仪检测亚麻木酚素抑制 IL-1 β 引起的细胞凋亡

培养 48 h 亚麻木酚素抑制 IL-1 β 引起细胞凋亡,模型对照组细胞凋亡较正常对照组明显增多,而亚麻木酚素和阳性对照药物可逆转这一现象(图 3)。空白对照组多为正常活细胞,模型对照组早期凋亡及中晚期凋亡细胞较多,而 5 μ M 的来曲唑均可以抑制生长板软骨细胞凋亡,20 μ M 的亚麻木酚素抑

制细胞凋亡的效果较好,优于阳性对照组(图 4)。各组引起细胞凋亡率情况见图 5,模型对照组、阳性对照组、亚麻木酚素组均明显高于正常对照组,阳性对照组和亚麻木酚素组明显低于模型对照组,亚麻木酚素组明显低于阳性对照组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 生长板在长骨生长中的重要作用

生长板是长骨纵向生长的原动力,也是生长期骨骼中最为脆弱的区域^[12-13],其位于长骨骺与干骺端之间,是一层具有纵向生长能力的透明软骨,其组织结构及基质成分呈梯级变化,受全身内分泌(包括

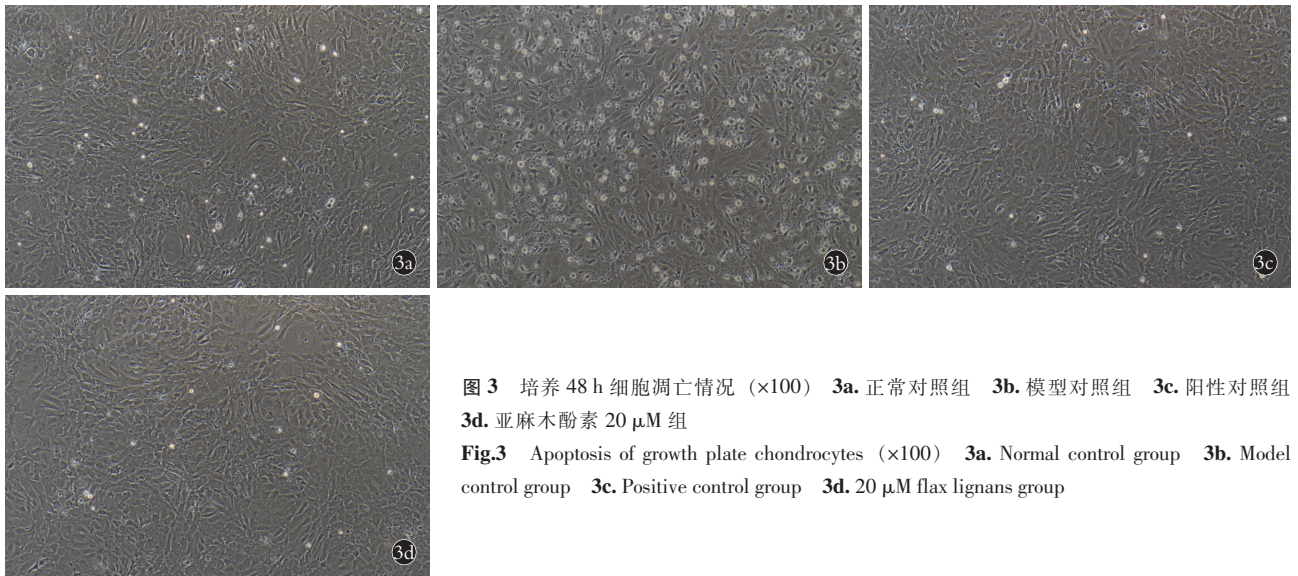


图 3 培养 48 h 细胞凋亡情况 ($\times 100$) 3a. 正常对照组 3b. 模型对照组 3c. 阳性对照组 3d. 亚麻木酚素 20 μ M 组

Fig.3 Apoptosis of growth plate chondrocytes ($\times 100$) 3a. Normal control group 3b. Model control group 3c. Positive control group 3d. 20 μ M flax lignans group

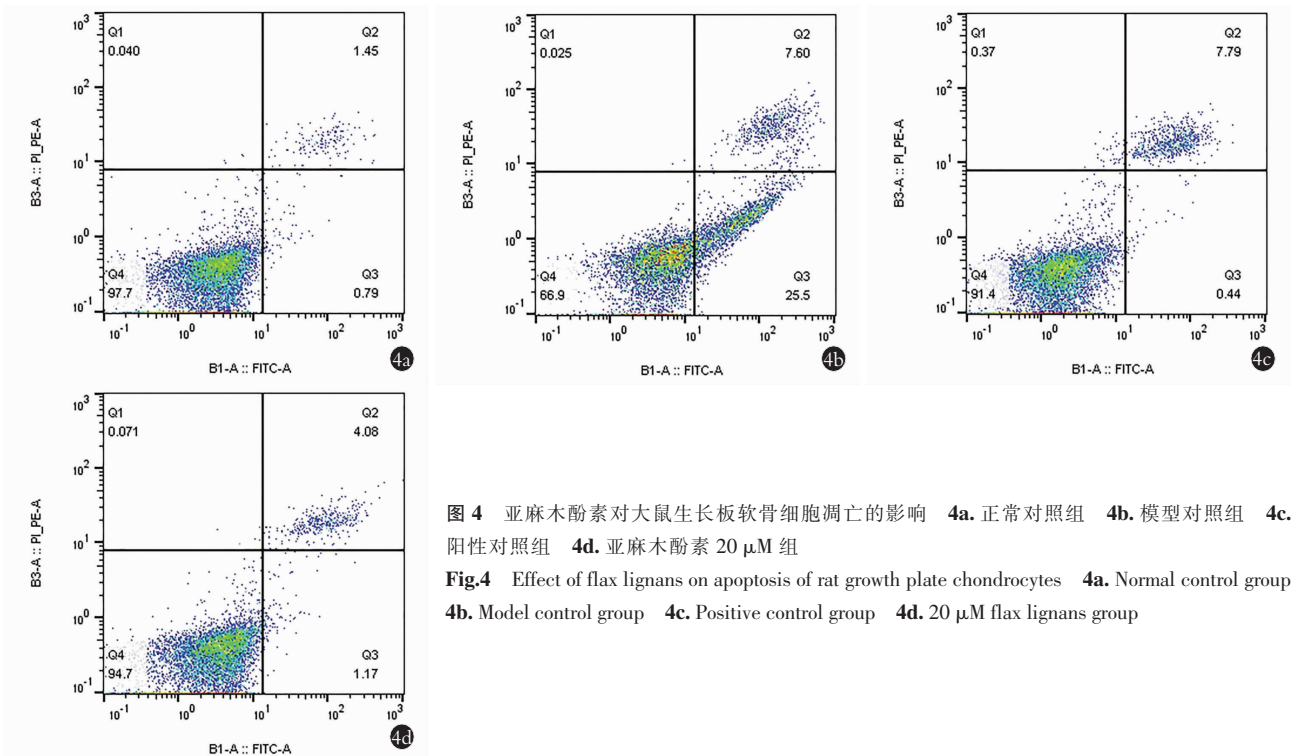
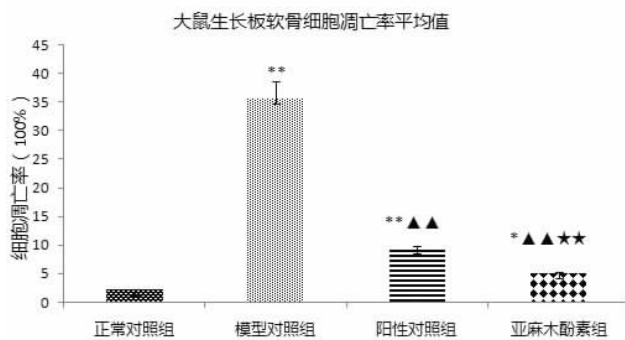


图 4 亚麻木酚素对大鼠生长板软骨细胞凋亡的影响 4a. 正常对照组 4b. 模型对照组 4c. 阳性对照组 4d. 亚麻木酚素 20 μ M 组

Fig.4 Effect of flax lignans on apoptosis of rat growth plate chondrocytes 4a. Normal control group 4b. Model control group 4c. Positive control group 4d. 20 μ M flax lignans group



注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。与模型对照组比较, ▲ $P < 0.01$ 。与阳性对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 5 亚麻木酚素对生长板软骨细胞凋亡的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

Note: Compared with normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the model control group, ▲ $P < 0.01$. Comparison with positive control group, ** $P < 0.01$

Fig.5 Inhibitory effect of flax lignans on growth plate chondrocytes apoptosis ($\bar{x} \pm s$)

激素及生长因子)和局部旁分泌、自分泌(多种生长因子)的调控^[14-16],生长板软骨由软骨细胞和细胞基质组成,不含纤维血管组织,用酶把基质消化后就可分离出大量高纯度的软骨细胞。生长板软骨细胞的增殖、软骨基质合成及肥大后体积增大均产生线性生长,任何对软骨细胞的增殖、分化过程具有调节作用的因素均能影响线性生长。

3.2 雌激素在骨骺闭合中的作用及合成的芳香化酶抑制剂对雄激素向雌激素转变的影响

雌激素是人体一种重要的内源性激素,具有非常重要的生物学功能,包括对生殖系统、骨与软骨系统、心脑血管系统等新陈代谢具有显著的调控作用^[17-19]。研究表明,雌激素在骨形成代谢过程中起着重要作用,在生长板软骨细胞闭合过程中是必不可少的因素,雌激素可能通过调节软骨细胞周期影响生长板的生长和老化过程,其机制涉及生长板软骨细胞增殖率降低^[20-21]。研究发现,雌激素是促进骨龄成熟、触发骨骺闭合的关键激素,雌激素受体抵抗及芳香化酶缺乏症的男性患者骨骺一直不能闭合从而导致高身材,这为儿童内分泌领域疾病,尤其是儿童生长发育性疾病的治疗提供了延缓骨骺愈合的有效工具,芳香化酶抑制剂通过抑制芳香化酶活性,可有效降低雌激素水平,近 20 年来,芳香化酶抑制剂在国外逐渐被应用于纤维性骨营养不良综合征、男性乳房发育、身材矮小症等儿童内分泌疾病的治疗,取得了一定疗效。来曲唑和阿那曲唑作为第 3 代非甾体类芳香化酶抑制剂^[22-24],具有可逆性、高效性和相对安全性,在国内也逐渐被应用于儿童内分泌领域^[25-26],故本实验阳性对照组联合给予来曲唑干预。

然而,钙流失,骨质疏松,严重者可发生骨折,关节痛,肌肉痛,血脂异常,增加心血管系统的风险是芳香化酶抑制剂类药物临床常见的不良反应,而且对骨代谢的远期影响尚不清楚。

3.3 天然产物来源的芳香化酶抑制剂亚麻木酚素在延迟骨骺闭合中的作用

从天然产物中筛选芳香化酶抑制剂是寻找芳香化酶抑制剂的主要途径之一,相关研究^[27]证实具有芳香化酶抑制作用的多酚类化合物主要有白藜芦醇和木酚素及其代谢产物肠内脂 (enterolactone, ENL) 和肠二醇 (enterodiol, END)。木酚素是一种植物多酚,结构与人雌激素十分相似,亚麻籽中含量最高。食用木酚素后经肠道微生物酵解转化为 END 和 ENL。END 和 ENL 都具有较弱的雌激素和抗雌激素活性。体外实验显示,END 和 ENL 能显著抑制人结肠癌细胞的增殖,而 ENL 能抑制雌二醇诱导的 MCF-7 细胞增殖。其机制可能与二者同雌二醇竞争 II 型雌激素受体,诱导性激素结合球蛋白,抑制芳香化酶,以及抗氧化等作用有关。

亚麻木酚素由亚麻籽提炼所得,占籽份量的 0.9%~1.5%,作为天然的芳香化酶抑制剂的一种,与芳香化酶中的细胞色素 P450 特异性结合,阻碍还原型辅酶 II 脱氢氧化过程,可逆性地抑制酶的活性,有效延缓骨龄,改善预测成年身高。据报道,亚麻木酚素能提高患者血清钙含量和体内骨量,提高骨对甲状腺旁腺激素的敏感程度,促进形成新的骨基质,对克制骨质流失有显著效果^[28],其预防和诊治女性由于绝经后导致的骨质疏松的临床疗效已被证实^[29]。

3.4 亚麻木酚素适宜做抑制骨骺闭合的临床用药

亚麻木酚素对生长板软骨细胞增殖的影响未见相关报道,笔者前期实验发现亚麻木酚素有提高生长板软骨细胞增殖率,抑制生长板软骨细胞凋亡的效果,本实验结果显示 DMSO 组与正常对照组细胞增殖比较差异无统计学意义,只加亚麻木酚素 20 μM 组与正常对照组比较细胞增殖差异无统计学意义,说明配置亚麻木酚素的溶解物 DMSO 对实验无影响,且亚麻木酚素不引起细胞增殖。其 1、10、20、40 μM 亚麻木酚素对生长板软骨细胞的增殖作用均为抑制了 IL-1 β 引起的细胞凋亡引起的,大鼠生长板软骨细胞在 20 μM 亚麻木酚素刺激下,抑制细胞凋亡作用明显,且效果优于阳性对照来曲唑组,提示亚麻木酚素可以抑制生长板软骨细胞的凋亡,从而延迟骨骺闭合,延长骨骼生长过程,促进身高的继续增高。由于亚麻木酚素来自天然产物亚麻籽,其产量大,副作用小,使其成为抑制骨骺闭合的理想用药,证明其有抑制生长板软骨细胞凋亡,延迟骨骺闭

合的作用为今后亚麻木酚素在临床使用的可能提供理论支持。

参考文献

- [1] 张进丽. 亚麻木酚素(SDG)治疗中老年女性骨质疏松症的临床研究[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 21(31):64-66.
ZHANG JL. Clinical study of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) in treatment of osteoporosis in middle-aged and old women [J]. Zhongguo Xian Dai Yi Xue Za Zhi, 2013, 21(31):64-66. Chinese.
- [2] Dan D, Calin A, Doina H, et al. Flaxseed lignans and polyphenols enhanced activity in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Biology, 2021, 10(1):43-44.
- [3] 刘寒, 郭亚净, 赵亚硕, 等. 亚麻木酚素通过抑制 TXNIP 和激活 NLRP3 炎症小体减轻慢性间歇性低氧小鼠肾脏炎症损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(9):1631-1638.
LIU H, GUO YJ, ZHAO YS, et al. Secoisolariciresinol diglucoside attenuates renal inflammatory injury of mice induced by chronic intermittent hypoxia via inhibiting TXNIP and activating NLRP3 inflammasome [J]. Zhongguo Bing Li Sheng Li Za Zhi, 2020, 36(9):1631-1638. Chinese.
- [4] Mayuri S, Kritika D, Yogesh G, et al. A review on newer techniques in extraction of oleaginous flaxseed constituents [J]. Oilseeds Fats Crops Lipids, 2019, 26:14.
- [5] Mu oz O, Fuentealba C, Ampuero D, et al. The effect of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei on the in vitro bioaccessibility of flaxseed lignans (Linum usitatissimum L.) [J]. Food Function, 2018, 9(4):2426-2432.
- [6] Hamadeh IS, Patel JN, Rusin S, et al. Personalizing aromatase inhibitor therapy in patients with breast cancer [J]. Cancer Treat Rev, 2018, 70:47-55.
- [7] 孔元梅, 陈虹, 梁黎, 等. 芳香化酶抑制剂联合生长激素治疗青春前期身材矮小症男性患儿的临床研究[J]. 浙江大学学报(医学版), 2020, 4(6):283-290.
KONG YM, CHEN H, LIANG L, et al. Aromatase inhibitors combined with growth hormone treatment of adolescent boys with short stature [J]. Zhe Jiang Da Xue Xue Bao (Yi Xue Ban), 2020, 4(6):283-290. Chinese.
- [8] Maria S, Miguel GA, Hans G, et al. Aromatase inhibitors use and risk for cardiovascular disease in breast cancer patients: A population-based cohort study [J]. Breast, 2021, 59:157-164.
- [9] Sood A, Lang DK, Kaur R, et al. Relevance of aromatase inhibitors in breast cancer treatment [J]. Curr Top Med Chem, 2021, 21(15):1319-1336.
- [10] Pavese F, Parisi A, Rotondaro S, et al. Bone recurrence in early breast cancer patients: The paradox of aromatase inhibitors induced bone resorption [J]. Breast Dis, 2021, 40(4):257-262.
- [11] 于波, 王俊祺, 王伟, 等. 雌二醇对大鼠生长板软骨细胞 C 型利钠肽及胰岛素样生长因子 1 表达的影响 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(8):1074-1078.
YU B, WANG JQ, WANG W, et al. Effect of estradiol on C type natriuretic peptide and insulin like growth factor 1 expression in rat growth plate chondrocytes [J]. Shang Hai Jiao Tong Da Xue Xue Bao (Yi Xue Ban), 2017, 37(8):1074-1078. Chinese.
- [12] Yang L, Fan CD, Shu T, et al. Punicalin alleviates TNF- α and IL-1 β -induced chondrocyte dysfunction and cartilage metabolism via mediating FOXO3 signaling axis [J]. J Food Biochem, 2021, e13755.
- [13] 谢杨丽, 谭乔燕, 罗凤涛, 等. 生长板损伤修复的研究进展 [J]. 中华创伤骨科杂志, 2020, 22(1):88-92.
XIE YL, TAN QY, LUO FT, et al. Research advances in repair of growth plate injury [J]. Zhonghua Chuang Shang Gu Ke Za Zhi, 2020, 22(1):88-92. Chinese.
- [14] Asmussen NC, Cohen DJ, Lin Z, et al. Specific microRNAs found in extracellular matrix vesicles regulate proliferation and differentiation in growth plate chondrocytes [J]. Calcif Tissue Int, 2021, 109(4):455-468.
- [15] 许思宇, 梅海波. 骺板骨桥的发生机制及治疗研究进展 [J]. 中华小儿外科杂志, 2021, 42(4):379-384.
XU SY, MEI HB. Advances in the mechanisms and treatments of bone bridge formation [J]. Zhonghua Xiao Er Wai Ke Za Zhi, 2021, 42(4):379-384. Chinese.
- [16] 朱岷, 雄丰. 骨骺发育障碍与生长 [J]. 中国实用儿科杂志, 2020, 35(6):455-460.
ZHU M, XIONG F. Epiphyseal developmental disorders and growth [J]. Zhongguo Shi Yong Er Ke Za Zhi, 2020, 35(6):455-460. Chinese.
- [17] 唐金烁, 周忠圣, 肖建林, 等. 骨性关节炎发病机制的研究进展 [J]. 中国骨伤, 2021, 34(10):985-990
TANG JS, ZHOU ZS, XIAO JL, et al. Research progression in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2021, 34(10):985-990. Chinese.
- [18] Suh MJ, Oh SK, Lee SB, et al. Effects of endogenous and exogenous oestrogen exposure on hearing level in postmenopausal women: A cross-sectional study [J]. Clin Otolaryngol, 2021, 46(3):508-514.
- [19] Liao CS, Mogan P, Thomas W. Oestrogen actions contribute to female gender-specific risks in the development of lung carcinoma [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2021, 208:105786.
- [20] Qi X, Wang F, Chun C, et al. A validated mouse model capable of recapitulating the protective effects of female sex hormones on ascending aortic aneurysms and dissections (AADs) [J]. Physiol Rep, 2020, 8(22):14631.
- [21] 刘海, 李林福, 施伟梅, 等. 雌激素受体在骨形成代谢中的研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(7):1656-1661.
LIU H, LI LF, SHI WM, et al. Progress on the role of estrogen receptor in bone formation and metabolism [J]. Ji Yin Zu Xue Yu Ying Yong Sheng Wu Xue, 2016, 35(7):1656-1661. Chinese.
- [22] Franik S, Eltrop SM, Kremer JA, et al. Aromatase inhibitors (letrozole) for subfertile women with polycystic ovary syndrome [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2018, 5(5):Cd010287.
- [23] Papadimitriou DT, Dermizaki E, Papagianni M, et al. Anastrozole improves near adult height in boys with compromised height potential, as monotherapy or in combination with a GnRH analogue [J]. J Endocrine Society, 2021, 5(1):673.
- [24] Cairns J, Ingle JN, Dudenkov TM, et al. Pharmacogenomics of aromatase inhibitors in postmenopausal breast cancer and additional mechanisms of anastrozole action [J]. JCI Insight, 2020, 5(16):e137571.
- [25] 王春林, 梁黎. 第三代非甾体类芳香化酶抑制剂在儿科内分泌临床应用的再认识 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2020, 4(1):275-282.

- WANG CL, LIANG L. Reconsideration of the third-generation non-steroidal aromatase inhibitors in pediatrics[J]. *Zhe Jiang Da Xue Xue Bao (Yi Xue Ban)*, 2020, 4(1): 275-282. Chinese.
- [26] Ingle JN, Cairns J, Suman VJ, et al. Anastrozole has an association between degree of estrogen suppression and outcomes in early breast cancer and is a ligand for estrogen receptor α [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(12): 2986-2996.
- [27] 徐文珊, 黄鸣清, 陈修平, 等. 天然产物来源的芳香化酶抑制剂研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(4): 1008-1011.
- XU WS, HUANG MQ, CHEN XP, et al. Research progress of aromatase inhibitors from natural products[J]. *Shi Zhen Guo Yi Guo Yao*, 2012, 23(4): 1008-1011. Chinese.
- [28] García-Mateos D, García-Villalba R, Otero JA, et al. An altered tissue distribution of flaxseed lignans and their metabolites in Abcg2 knockout mice[J]. *Food Funct*, 2018, 9(1): 636-642.
- [29] 王冬生, 韩婧, 康文博, 等. 植物雌激素防治骨质疏松作用的机制进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(5): 632-640.
- WANG DS, HAN J, KANG WB, et al. Research progress in the mechanism of phytoestrogens in the prevention and treatment of osteoporosis[J]. *Zhongguo Gu Zhi Shu Song Za Zhi*, 2016, 22(5): 632-640. Chinese.

(收稿日期: 2022-05-20 本文编辑: 王玉蔓)

· 病例报告 ·

后壁截骨治疗特殊髌臼后柱伴臼顶嵌顿压缩骨折 1 例

刘东, 王志强, 阳波, 李磊, 温洋

(遂宁市中心医院骨科, 四川 遂宁 629000)

关键词 截骨术; 髌臼; 骨折; 病例报告

中图分类号: R683

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2022.11.016

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Posterior wall osteotomy for treatment of a special posterior column of acetabulum with incarcerated compression fracture of acetabulum top: a case report LIU Dong, WANG Zhi-qiang, YANG Bo, LI Lei, and WEN Yang. Department of Orthopaedics, Suining Central Hospital, Suining 629000, Sichuan, China

KEYWORDS Osteotomy; Acetabulum; Fractures; Case reports

患者,男,60岁,2020年2月因车祸伤后左髌部、左前臂疼痛伴活动受限1d入院。入院前1d患者发生车祸(具体机制不详),致左髌部、左前臂疼痛,伴活动受限,无法行走,伴左膝疼痛,伴头昏及胸壁疼痛,伤后无意识障碍、恶心呕吐、四肢麻木无力,无胸闷气紧、腹痛等。于当地县医院就诊,DR及CT提示左侧尺桡骨骨折,左侧髌臼骨折;腹部彩超提示:左侧脾挫伤。予以左前臂石膏固定,左髌臼关节脱位手法复位等治疗后转入我院。入院后专科查体:左髌部肿胀压痛,左髌部主动被动活动受限,远端感觉循环未见异常。左前臂石膏固定,远端感觉循环未见异常。行DR及CT提示左侧尺桡骨骨折,左侧髌臼骨折;腹部彩超提示左侧脾挫伤。骨盆DR线片显示左髌臼正位片见髌耻、髌坐线完整,泪点无移位。CT平扫轴位髌臼后方压缩骨折(图1a),冠状位髌臼

顶压缩骨折(图1b)。3D-CT前面观见股骨头骨折(图1c),后面观自臼上部后壁连同左坐骨支的一半向后轻度移位;坐骨支冠状位纵向劈裂至坐骨结节,坐骨结节完整(图1d)。入院诊断:左髌臼骨折,左股骨头骨折,左尺桡骨骨折。伤后7d取侧卧位Kocher-Langenback入路,切开外旋肌见髌周软组织挫伤,坐骨神经与周围组织轻度粘连,根据术前设计显露后壁横行骨折线(图1e),设计反“L”形截骨线(图1f),掀开截骨块,暴露后上方塌陷的髌臼顶(图1g、1h),截骨、骨折复位,空心螺钉固定,复位截骨块后2块钢板螺钉固定。手术时间2.5h,术后无坐骨神经损伤症状。术后复查骨盆正位DR片(图1i)示钢板螺钉位置在位;3D-CT后面观(图1j)示复位固定好,轴位(图1k)示嵌顿塌陷后壁骨折复位理想,冠状位(图1l)示髌臼后上塌陷髌臼顶复位理想。术后负压引流24h,3d后开始CPM关节锻炼。术后1年随访X线显示骨折内固定在位,左髌关节间歇变窄(图1m);左髌关节功能好(图1n)。

通讯作者:刘东 E-mail:liudongsuining@163.com

Corresponding: LIU Dong E-mail: liudongsuining@163.com