

孙尚, 邹达, 赵振达, 等. 基于大鼠 OVX 模型研究雌激素缺乏对终板软骨细胞退变的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (5): 16-22.

Sun S, Zou D, Zhao ZD, et al. Degeneration of chondrocytes in cartilage endplate due to estrogen deficiency based on rat OVX model [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 16-22.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.05.003

## 基于大鼠 OVX 模型研究雌激素缺乏对终板软骨细胞退变的影响

孙尚<sup>1</sup>, 邹达<sup>2</sup>, 赵振达<sup>2</sup>, 蒋媛<sup>1</sup>, 杨子欢<sup>1</sup>, 陈龙艇<sup>1</sup>, 李危石<sup>2</sup>, 宋纯理<sup>3</sup>, 冷慧杰<sup>1\*</sup>

(1. 北京大学第三医院骨科, 北京 100191; 2. 骨与关节精准医学工程研究中心, 北京 100191;  
3. 脊柱疾病研究北京市重点实验室, 北京 100191)

**【摘要】** 目的 探究雌激素缺乏对终板软骨细胞退变的影响。方法 选取 6 月龄大鼠 40 只, 分为两组: 双侧卵巢切除实验组 (OVX) 和假手术对照组 (SHAM)。术后 9 周取材, 分别进行软骨终板组织的提取和原代终板软骨细胞的培养。免疫组化实验对比 SHAM 组和 OVX 组的软骨终板组织 II 型胶原 (COL-II) 的表达情况。倒置相差显微镜和甲苯胺蓝细胞染色观察细胞形态来鉴定终板软骨细胞。CCK-8 法对比两组终板软骨细胞的活力情况。罗丹明标记的鬼笔环肽荧光染色观察 OVX 后终板软骨细胞 F-actin 的改变情况。细胞免疫荧光检测终板软骨细胞在雌激素缺乏后 COL-II 的改变情况。RT-qPCR 法对比两组的 *SOX9*、*ACAN*、*ADAMTS-5*、*MMP13* 和 *COL-X* 的表达有无差异。结果 与对照组相比较, OVX 组的软骨终板的 COL-II 蛋白表达减低。终板软骨细胞的形态大多呈多角形和梭形, 铺路石样排列。OVX 的终板软骨细胞活力降低, 细胞骨架更加紊乱, 应力纤维增多, 迁移能力下降, COL-II 表达降低。与对照组相比, OVX 组的终板软骨细胞 *SOX9* 和 *ACAN* 表达降低, *MMP13*、*ADAMTS-5* 和 *COL-X* 表达升高。结论 雌激素缺乏会使终板软骨细胞发生退变。OVX 后的终板软骨细胞活力下降、迁移能力降低、软骨合成减低伴随细胞外基质的降解和细胞肥大分化增加。

**【关键词】** 终板; 退变; 雌激素缺乏; 软骨细胞

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0016-07

## Degeneration of chondrocytes in cartilage endplate due to estrogen deficiency based on rat OVX model

SUN Shang<sup>1</sup>, ZOU Da<sup>2</sup>, ZHAO Zhenda<sup>2</sup>, JIANG Ai<sup>1</sup>, YANG Zihuan<sup>1</sup>, CHEN Longting<sup>1</sup>, LI Weishi<sup>2</sup>,  
SONG Chunli<sup>3</sup>, LENG Huijie<sup>1\*</sup>

(1. Peking University Third Hospital, Department of Orthopaedics, Beijing 100191, China. 2. Engineering Research Center of Bone and Joint Precision Medicine, Beijing 100191. 3. Beijing Key Laboratory of Spinal Disease Research, Beijing 100191)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of estrogen deficiency on the degeneration of spinal endplate chondrocytes. **Methods** Forty 6-month-old rats were divided into ovariectomy (OVX) and sham operation groups. All of the rats were sacrificed at week 9 after operation. The cartilage endplate tissue was extracted, and endplate chondrocytes were cultured. The expression of COL-II in the cartilage endplate tissue was evaluated by immunohistochemistry. The cells

**【基金项目】** 国家自然科学基金 (12172011, 11872076, 11472017)。

**【作者简介】** 孙尚 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 终板退变机制。E-mail: sun\_shang11@163.com

**【通信作者】** 冷慧杰 (1975—), 男, 副研究员, 博士生导师, 研究方向: 骨与关节生物学与力学。E-mail: lenghj@bjmu.edu.cn

were stained by toluidine blue to identify endplate chondrocytes. The viability of endplate chondrocytes was detected by CCK-8. Fluorescence staining of rhodamine-labeled phalloidin was used to observe the changes of F-actin after OVX. Cellular immunofluorescence was performed to detect the changes of COL-II of endplate chondrocytes. The expression levels of *SOX9*, *ACAN*, *ADAMTS-5*, *MMP13* and *COL-X* were compared between the two groups by RT-qPCR. **Results** After OVX, the expression of COL-II protein in the cartilage endplates was decreased. Most of the chondrocytes in the endplates were polygonal and fusiform, arranged like paving stones. Endplate chondrocytes of OVX demonstrated more disordered cytoskeleton, decreased viability, increased stress fibers, decreased migration ability, and lower COL-II expression. For the OVX group, the expression of *SOX9* and *ACAN* in the endplate chondrocytes was decreased, while that of *ADAMTS-5*, *MMP13* and *COL-X* was increased. **Conclusions** Estrogen deficiency can cause degeneration of endplate chondrocytes.

**【Keywords】** endplate; degeneration; estrogen deficiency; chondrocyte

内源性雌激素缺乏是导致更年期妇女各种健康问题的重要原因之一<sup>[1-2]</sup>。妇女绝经后,不仅骨质疏松高发,并且骨关节炎和椎间盘退变的发生率也高于同龄的男性<sup>[3-5]</sup>。雌激素不仅影响骨组织重建,对关节软骨、纤维环以及髓核组织的代谢同样有重要的影响。雌激素缺乏带来的脊柱病变(椎体骨质疏松和椎间盘退变等)可以导致患者严重疼痛和残疾<sup>[6]</sup>。软骨终板位于椎骨和椎间盘之间,是脊柱重要的组成部分。软骨终板可以承担和分散脊柱压力,具有防止椎间盘突入相邻椎骨的重要作用<sup>[7]</sup>。除此之外,椎间盘作为无血管组织,营养运输和物质代谢需要依赖软骨终板<sup>[7]</sup>。软骨终板的退变会影响椎间盘的正常形态,阻碍椎间盘的营养和代谢,是椎间盘退变的前驱因素<sup>[8]</sup>。而椎间盘退变会降低其承重能力和活动性,导致腰痛和坐骨神经痛,造成患者的严重疼痛和残疾。研究软骨终板的退变机制可能是寻找治疗椎间盘退变方法的一把钥匙,而雌激素缺乏影响软骨终板退变的影响还有待研究。

多项研究发现雌激素可以减轻终板软骨细胞的变性,并上调 COL-II 以促进软骨细胞分化<sup>[9]</sup>。雌激素可以参与调节软骨细胞的老化,而细胞老化是细胞退变的一个重要标志<sup>[10]</sup>。软骨细胞是软骨终板的主要细胞类型,软骨终板退变的过程主要取决于软骨细胞的变化,而雌激素缺乏时,终板软骨细胞的变化还未有报道。本研究探讨雌激素缺乏对终板软骨细胞变化的影响,这有助于帮助人们认识绝经妇女软骨终板退变的机制,并可能为雌激素缺乏引起脊柱疾病提供一种新的治疗方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

采用 SPF 级 6 月龄 SD 雌性大鼠 40 只,体重为

290~320 g,购买自北京大学医学部实验动物中心[SCXK(京)2021-0013],饲养于北京大学医学部实验动物中心[SCXK(京)2021-0064]。大鼠饲养环境湿度 40%~50%,温度(23±2)℃,12 h 光照/12 h 黑暗交替,自由饮食和活动。实验动物符合 3R 原则,经北京大学实验动物伦理委员会审查(LA2019209),符合动物伦理。

### 1.2 主要试剂与仪器

4%多聚甲醛溶液(中国 Servicebio 公司,批号:CR2106101);EDTA 脱钙液(中国 Coolaber 公司,批号:SL31131120);兔抗大鼠 collagen II(美国 Abcam 公司,批号:GR3395339-1);DMEM 低糖培养基(美国 Hyclone 公司,批号:AG29820714);胎牛血清(中国美仑公司,批号:J0101A);CCK-8 检测试剂盒(日本同仁公司,批号:TH531);TRIzol(美国 Sigma 公司,批号:BCCD7547);DEPC 处理水(中国碧云天公司,批号:R0022);逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司,批号:00987373);SYBR Select Master Mix(美国 Applied Biosystems 公司,批号:00722083);戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司,批号:20170308)。

石蜡切片机(Lecia,德国)倒置荧光显微镜(Nikon,日本);酶标仪(Thermo,美国),实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems,美国);Nanodrop 2000C(滨松,日本)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 分组、造模与处理

手术当天测量体重后,随机选择分组,20 只为双侧卵巢切除实验组(OVX),其余 20 只为假手术组(SHAM)。大鼠腹腔注射 2%戊巴比妥钠 40 mg/kg 进行麻醉。在大鼠背外侧行 1.5 cm 的切口来暴露卵巢,在输卵管或子宫远端结扎去除两侧完整卵巢组织并闭合伤口。手术后肌肉注射抗生素(青霉素,40 kU/kg)。术后第 9 周,过量腹腔注射 2%戊巴

比妥钠(120 mg/kg)安乐死。取腰椎组织进行后续实验。

1.3.2 提取和培养原代终板软骨细胞

将腰椎组织浸泡于 75%乙醇消毒 15 min,在超净台内分离软组织,取出软骨终板,剪碎,使用 0.2% II 型胶原酶 37℃ 消化 4~6 h,软骨组织被消化成沫状,加入完全培养基终止消化后,立即 800 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 DMEM 低糖培养基(加入 10%胎牛血清+2%双抗)种于 5 cm 培养瓶内。待终板软骨细胞长满后,用胰酶消化传代,采用 P2 细胞。

1.3.3 CCK-8 实验检测细胞活力

将终板软骨细胞以  $5\times 10^3$  密度接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,避光,以换液形式每孔加入 100  $\mu$ L 含 CCK-8 增强型溶液的完全培养基,不可产生气泡,置于 37℃ 培养箱孵育 1 h,使用酶标仪检测每个孔在 450 nm 波长下的吸光度值。

1.3.4 罗丹明标记的鬼笔环肽染色

将终板软骨细胞以  $3\times 10^4$  密度置于 24 孔板,弃培养基,PBS 洗 3 次,每次 3 min,加入 4%多聚甲醛室温固定 20 min,弃固定液,PBS 洗 3 次,每次 3 min,按 1:200 加入鬼笔环肽染色液避光室温孵育 1 h,弃染色液,PBS 洗 3 次,每次 3 min,加入 DAPI 染色剂避光孵育 3 min 后置于荧光显微镜观察。

1.3.5 COL-II 免疫荧光染色

将终板软骨细胞以  $3\times 10^4$  密度置于 24 孔板,待细胞长满后,弃培养基,PBS 洗 3 次,每次 3 min,加入 4%多聚甲醛固定细胞 20 min,弃固定液,PBS 洗 3 次,每次 3 min,加入细胞通透液通透 5 min,弃通透液,加入细胞封闭液封闭 20 min,弃封闭液,PBS 洗 3 次,每次 3 min,按 1:100 加入 II 型胶原一抗 4℃ 过夜孵育,弃一抗,PBS 洗 3 次,每次 3 min,1:200 加入二抗室温避光孵育 1 h,弃染色液,PBS 洗 3 次,每次 3 min,加入 DAPI 染色剂避光孵育 3 min 后置于荧光显微镜观察。

1.3.6 RT-qPCR 实验检测基因表达

使用 TRIzol 从终板软骨细胞中提取总 RNA。RNA 的浓度和纯度通过 Nanodrop 2000C 测量。使用逆转录试剂盒将 1  $\mu$ g RNA 用于逆转录,最终反应体积为 20  $\mu$ L。ABI QuantStudio5 Q5 实时荧光定量 PCR 仪用于实时逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。使用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法将终板软骨基因的相对转录水平标准化,例如 *SOX9*、*ACAN*、*ADAMTS-5*、*MMP-13* 和 *COL-X*。使用 GAPDH 为内参。引物序列见表 1。

1.3.7 COL-II 免疫组化检测

腰椎标本用 10 倍体积的 4%多聚甲醛固定。标本固定后在 EDTA 脱钙液中脱钙至少 4 周。将脱钙样品嵌入石蜡中并切成 4  $\mu$ m 厚的切片。用 COL II 抗体在 4℃ 下孵育切片过夜,之后二抗孵育,最后用 DAB 显色。使用全自动全景扫描仪对切片进行拍照,并使用 Image Pro Plus 6 分析软件进行免疫组化切片的半定量分析。

1.4 统计学方法

所有数据均以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用 SPSS 24.0 软件(SPSS, Chicago, 美国)进行数据分析。使用 *t* 检验(1 个变体,两组)来计算统计差异。 $P<0.05$  具有统计意义。

2 结果

2.1 软骨终板的 COL-II 表达的比较

COL-II 是软骨组织重要的组成部分。在术后 9 周观察发现,相比较于 SHAM 组,OVX 组的软骨终板的 COL-II 表达降低(图 1)。

2.2 终板软骨细胞形态及鉴定结果

终板软骨细胞于 5 d 左右从组织块中爬出,形态以多角形、梭形为主,以铺路石样形态爬满瓶底。甲苯胺蓝染色可见细胞核呈深蓝色,胞质为浅蓝色,内有少量蓝紫色异染颗粒,与软骨细胞的特征一致<sup>[11]</sup>(图 2)。

表 1 引物设计  
Table 1 Primer design

| 目的基因<br>Primers | 正向引物(5'-3')<br>Forward primer (5'-3') | 反向引物(5'-3')<br>Reverse primer (5'-3') |
|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>SOX9</i>     | GAAGAATGGGCAAGCAGAGG                  | CTTGACGCTCTGTTTGGGAG                  |
| <i>ACAN</i>     | CGAGTGAACAGCATCTACC                   | GAGTCATTGGAGCGAAGG                    |
| <i>MMP-13</i>   | GATGATGCTAACACAGACTATG                | ATGCGATTACTCCAGATACT                  |
| <i>ADAMTS-5</i> | GCAAATCTTTCCGCCACGAG                  | GCCCTTAGCTCTGCACGTAA                  |
| <i>COL-X</i>    | GATGCCTCTTGTCAGTGCTAA                 | GTGCTGCTGCCTGTTGTA                    |
| <i>GAPDH</i>    | TCTCTGCTCCTCCCTGTTT                   | GGCTCTGCTCCTCCCTCC                    |

### 2.3 终板软骨细胞的细胞活力改变的情况

采用 CCK-8 实验检测 SHAM 组和 OVX 组终板软骨细胞的细胞活力,结果显示与 SHAM 组相比,72 h 内不同时间点,OVX 组终板软骨细胞的活力均显著低于 SHAM 组(图 3)。

### 2.4 OVX 后终板软骨细胞的细胞骨架 F-actin 改变的情况

采用罗丹明标记的鬼笔环肽进行细胞染色,观察两组终板软骨细胞细胞骨架 F-actin 的改变。实验发现,OVX 组的终板软骨细胞中的分布在细胞质膜周围的 F-actin 出现荧光增强,F-actin 的重排加剧,形成较多的应力纤维(图 4)。

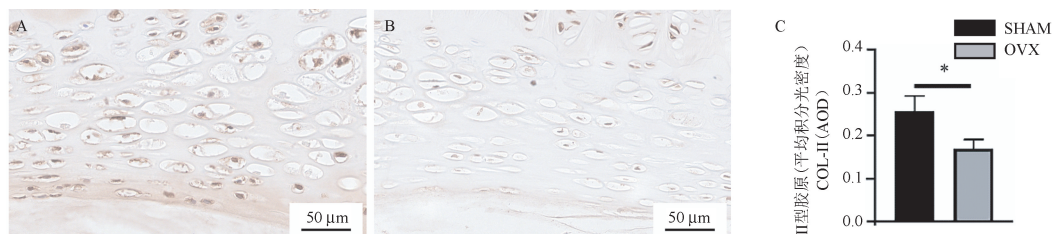
### 2.5 终板软骨细胞 COL-II 改变的情况

COL-II 免疫荧光染色后被荧光波段激发,细胞

质出现绿色荧光为阳性。实验结果显示 OVX 组荧光强度显著低于 SHAM 组,终板软骨细胞表达的 COL-II 明显减少(图 5)。

### 2.6 终板软骨细胞 SOX9、ACAN、MMP13、ADAMTS-5 和 COL-X 的基因表达

SOX9 和 ACAN 是代表软骨细胞合成情况的标志物,MMP13 和 ADAMTS-5 是代表软骨细胞分解代谢的标志物,COL-X 是软骨细胞肥大的代表性标志物。如图 6 所示,对比 SHAM 组,OVX 组的终板软骨细胞的 SOX9 和 ACAN 表达发生差异性降低,其合成能力下降;MMP13 和 ADAMTS-5 表达发生差异性升高,说明其软骨细胞外基质降解加剧;COL-X 的表达发生差异性增高,说明肥大钙化增强。

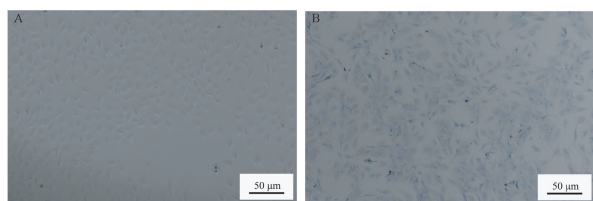


注:A;COL-II 在 SHAM 组软骨终板中的表达;B;COL-II 在 OVX 组软骨终板中的表达;C:各组大鼠软骨终板 II 型胶原定量比较。与 SHAM 组相比, \* $P < 0.05$ 。

图 1 SHAM 组和 OVX 组软骨终板 COL-II 的表达

Note. A, Expression of COL-II in cartilage endplates in SHAM group. B, Expression of COL-II in cartilage endplates in OVX group. C, Quantitative comparison of COL-II of cartilage endplates in rats in each group. Compared with SHAM group, \* $P < 0.05$ .

Figure 1 Expression of COL-II in cartilage endplates between SHAM and OVX groups

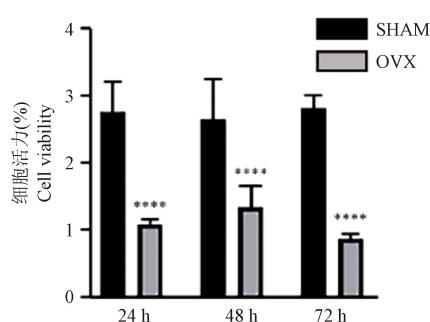


注:A;第 2 代终板软骨细胞,为多角形和梭形,呈铺路石样排列;B;甲苯胺蓝染色显示胞核为深蓝色,胞质为浅蓝色。

图 2 终板软骨细胞形态和鉴定

Note. A, Second generation endplate chondrocytes are polygonal and fusiform, arranged like paving stones. B, Toluidine blue staining shows the dark blue nucleus and the light blue cytoplasm.

Figure 2 Morphology and identification of endplate chondrocytes

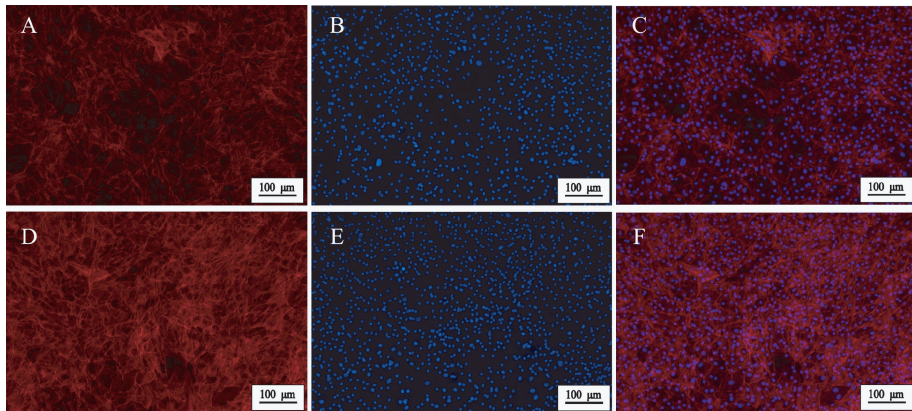


注:与 SHAM 组相比, \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图 3 SHAM 组和 OVX 组大鼠终板软骨细胞活力的对比

Note. Compared with SHAM group, \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

Figure 3 Comparison of the cell viability of endplate chondrocytes between SHAM and OVX group

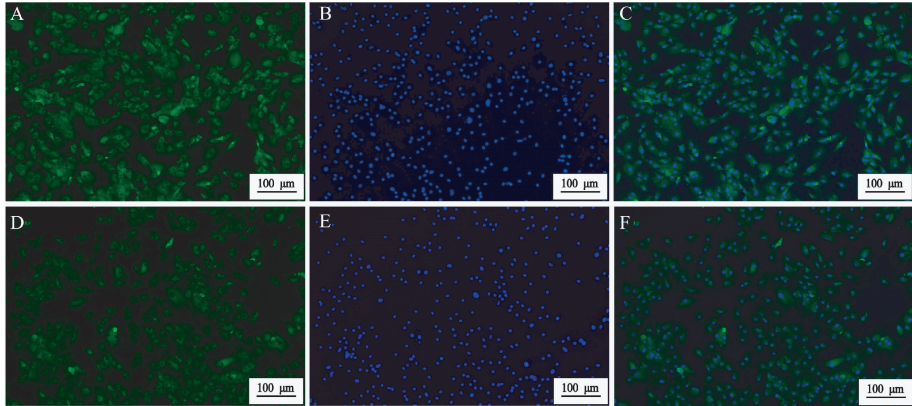


注:A~C;SHAM 组大鼠终板软骨细胞 F-actin 的表达(F-actin、DAPI、Merge);D~F:OVX 组大鼠终板软骨细胞 F-actin 的表达(F-actin、DAPI、Merge)。

图 4 细胞免疫荧光检测 SHAM 组和 OVX 组大鼠终板软骨细胞的 F-actin 的表达情况

Note. A~C, Expression of F-actin (F-actin, DAPI, Merge) of rats in the SHAM group. D~F, Expression of F-actin (F-actin, DAPI, Merge) of rat endplate chondrocytes in the SHAM group (F-actin, DAPI, Merge).

Figure 4 Cellular immunofluorescence detection of expression of F-actin in rat endplate chondrocytes in SHAM and OVX groups

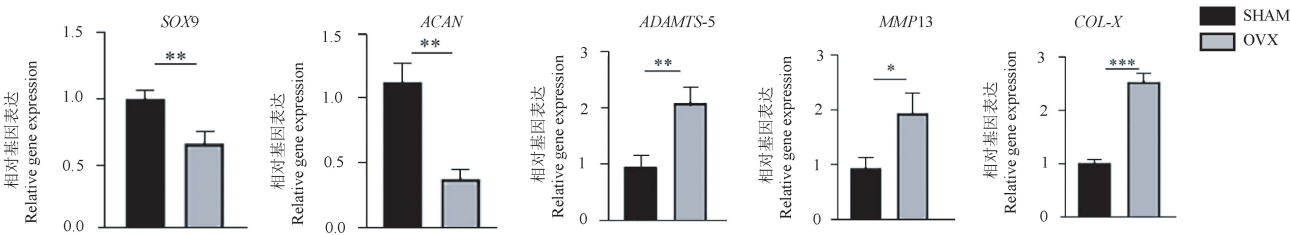


注:A~C;SHAM 组大鼠终板软骨细胞 COL-II 的表达(COL-II、DAPI、Merge);D~F:OVX 组大鼠终板软骨细胞 COL-II 的表达(COL-II、DAPI、Merge)。

图 5 细胞免疫荧光检测 SHAM 组和 OVX 组大鼠终板软骨细胞的 COL-II 的表达情况

Note. A~C, Expression of COL-II in endplate chondrocytes in the SHAM group (COL-II, DAPI, Merge). D~F, expression of COL-II in rat endplate chondrocytes in the SHAM group (COL-II, DAPI, Merge).

Figure 5 Cellular immunofluorescence detection of expression of COL-II in rat endplate chondrocytes in SHAM and OVX groups



注:SHAM 组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

图 6 对比两组终板软骨细胞基因 SOX9、ACAN、ADAMTS-5、MMP13 和 COL-X 表达

Note. Compared with SHAM group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

Figure 6 Comparison of the gene expressions of SOX9, ACAN, MMP13, ADAMTS-5 and COL-X in the endplate chondrocytes of the two groups

### 3 讨论

雌激素是一种重要的类固醇激素。作为一种全身性激素,雌激素可以调节细胞增殖、分化、衰老和死亡,对生育功能、神经功能、心血管健康、免疫系统和骨软骨系统等产生重要作用<sup>[12]</sup>。雌激素水平的迅速下降加速了全身器官组织的老化,绝经后妇女患相关疾病的概率增大,导致糖尿病、阿尔茨海默症、肌肉力量下降、骨质疏松和关节痛等多种病症<sup>[12-15]</sup>。既往研究发现雌激素缺乏与软骨退变息息相关。雌激素缺乏会抑制关节软骨细胞增殖和分化,加速关节骨-软骨转化<sup>[16-17]</sup>。雌激素缺乏时终板软骨细胞的变化还未见报道。细胞活力是软骨细胞状态与功能的首要体现。过往的研究中发现补充雌激素后,生长板软骨细胞的活力增强<sup>[18]</sup>。本研究结果发现,雌激素缺乏会降低终板软骨细胞的活力,显示了雌激素在软骨细胞活力方面作用的一致性。

COL-II 是软骨终板的主要组成之一,作为软骨组织含量最丰富的胶原蛋白,其在软骨终板和髓核的含量对维持正常的椎间盘形态起到至关重要的作用。Jiang 等<sup>[19]</sup>实验采用 6 月龄 SD 大鼠进行去卵巢手术,3 个月后发现 OVX 组的 COL-II 的表达相较于 SHAM 组发生显著性减低。Xiao 等<sup>[20]</sup>研究发现 8 周 C57BL/6J 小鼠 OVX 后,12 周后 OVX 的 COL-II 的表达发生显著性降低。我们的研究采用的是 6 月龄 SD 大鼠进行去卵巢手术,9 周后观察到 OVX 组的软骨终板中 II 型胶原的表达出现差异性降低。虽然采用的实验动物的种类、年龄和处理时间与过往的研究不同,但是实验结果皆表明雌激素缺乏会显著性降低软骨终板组织的 II 型胶原流失。Shi 等<sup>[18]</sup>研究发现,补充雌激素后的生长板软骨细胞 II 型胶原的免疫荧光强度增强,证明其表达增高。我们的免疫荧光实验发现,OVX 组的终板软骨细胞的 II 型胶原表达降低,这与动物组织染色实验的结果一致。

本研究发现在雌激素缺乏下,终板软骨细胞骨架 F-actin 重排加剧,应力纤维增加,细胞骨架更加紊乱。细胞肌动蛋白细胞骨架能为细胞迁移提供动力,同时也与细胞间粘附、细胞表面的机械特性和细胞生理学息息相关<sup>[21-22]</sup>。细胞间粘附作用可以影响软骨细胞分化过程,例如,细胞外基质蛋白通过整合素和其他细胞外基质受体发出的粘附信

号影响正常软骨细胞的增殖和肥大<sup>[23-24]</sup>。而肌动蛋白细胞骨架对细胞间粘附有重要作用。由此可见,肌动蛋白细胞骨架也可对软骨细胞分化产生重要影响。除此之外,有研究发现,软骨细胞的细胞骨架的紊乱会导致其损伤难以修复,有序的细胞骨架有助于软骨细胞的迁移和修复<sup>[25]</sup>。多种刺激可以影响到软骨细胞的细胞骨架。促炎因子信号可以促进肌动蛋白聚合或交联进而促进应力纤维的形成<sup>[26]</sup>。机械刺激会导致软骨细胞肌动蛋白聚合<sup>[27]</sup>。激素也可以调节软骨细胞肌动蛋白,例如,卵泡刺激素可以通过促进其重组来促进软骨细胞的退变<sup>[28]</sup>。我们的研究结果显示,雌激素缺乏使终板软骨细胞细胞骨架重排,抑制其分化和迁移,造成软骨终板的损伤。其机制是复杂的,可能涉及激素本身、力学传导信号以及促炎因子信号等多种通路。

本研究发现雌激素缺乏后,终板软骨细胞表型发生了改变。SOX9 是重要的促进软骨形成的转录因子。有研究发现生长板软骨中的肥大软骨细胞中 SOX9 的表达被抑制,但是在健康关节软骨中的永久性软骨细胞中正常表达<sup>[29]</sup>。ACAN 是终板软骨细胞的重要组成部分,它和 SOX9 是代表终板软骨细胞合成代谢的重要指标。我们的研究发现,雌激素缺乏会抑制二者的表达,进而抑制软骨终板合成。软骨终板的 MMP13 和 ADAMTS-5 会对软骨终板细胞外基质的降解产生重要影响,二者会导致 II 型胶原表达的减少和糖胺聚糖的流失<sup>[30]</sup>,除此之外,还会引起 X 型胶原的表达增加。作为软骨细胞的肥大标志物,X 型胶原的增多已被发现是软骨终板发生钙化的重要特征之一。本研究结果显示,雌激素缺乏会导致终板软骨细胞 MMP13、ADAMTS-5 和 COL-X 的基因表达上调,促进软骨终板的基质降解和肥大分化。

综上所述,雌激素缺乏会使终板软骨细胞活力降低,细胞骨架发生重排紊乱,抑制终板软骨细胞合成,促进细胞外基质降解和细胞肥大分化,其中机制有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Wilkinson HN, Hardman MJ. The role of estrogen in cutaneous ageing and repair [J]. *Maturitas*, 2017, 103: 60-64.
- [2] Trenti A, Tedesco S, Boscaro C, et al. Estrogen, angiogenesis, immunity and cell metabolism: solving the puzzle [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 859.

- [ 3 ] Muscat BY. Menopause and the intervertebral disc [ J ]. Menopause, 2017, 24(10): 1118-1121.
- [ 4 ] Hussain SM, Cicuttini FM, Alyousef B, et al. Female hormonal factors and osteoarthritis of the knee, hip and hand: a narrative review [ J ]. Climacteric, 2018, 21(2): 132-139.
- [ 5 ] Armas LA, Recker RR. Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights [ J ]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2012, 41(3): 475-486.
- [ 6 ] Pizzato S, Trevisan C, Lucato P, et al. Identification of asymptomatic frailty vertebral fractures in post-menopausal women [ J ]. Bone, 2018, 113: 89-94.
- [ 7 ] Moore RJ. The vertebral endplate: disc degeneration, disc regeneration [ J ]. Eur Spine J, 2006, 15 ( Suppl 3 ): S333-S337.
- [ 8 ] Luo L, Jian X, Sun H, et al. Cartilage endplate stem cells inhibit intervertebral disc degeneration by releasing exosomes to nucleus pulposus cells to activate Akt/autophagy [ J ]. Stem Cells, 2021, 39(4): 467-481.
- [ 9 ] Sun Q, Tian FM, Liu F, et al. Denosumab alleviates intervertebral disc degeneration adjacent to lumbar fusion by inhibiting endplate osteochondral remodeling and vertebral osteoporosis in ovariectomized rats [ J ]. Arthritis Res Ther, 2021, 23(1): 152.
- [ 10 ] Breu A, Sprinzing B, Merkl K, et al. Estrogen reduces cellular aging in human mesenchymal stem cells and chondrocytes [ J ]. J Orthop Res, 2011, 29(10): 1563-1571.
- [ 11 ] 于斐, 曾晖, 于红燕, 等. 软骨细胞特殊染色技术的比较与应用 [ J ]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(8): 58-61, 75, 89.
- [ 12 ] Patel S, Homaei A, Raju AB, et al. Estrogen: the necessary evil for human health, and ways to tame it [ J ]. Biomed Pharmacother, 2018, 102: 403-411.
- [ 13 ] Collins BC, Laakkonen EK, Lowe DA. Aging of the musculoskeletal system: How the loss of estrogen impacts muscle strength [ J ]. Bone, 2019, 123: 137-144.
- [ 14 ] Rettberg JR, Yao J, Brinton RD. Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body [ J ]. Front Neuroendocrinol, 2014, 35(1): 8-30.
- [ 15 ] Song HJ, Kim TH, Lee HH, et al. Cell therapy products in Alzheimer's disease [ J ]. J Menopausal Med, 2017, 23(1): 1-4.
- [ 16 ] Mei R, Lou P, You G, et al. 17 $\beta$ -Estradiol induces mitophagy upregulation to protect chondrocytes via the SIRT1-mediated AMPK/mTOR signaling pathway [ J ]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11: 615250.
- [ 17 ] Xu X, Li X, Liang Y, et al. Estrogen modulates cartilage and subchondral bone remodeling in an ovariectomized rat model of postmenopausal osteoarthritis [ J ]. Med Sci Monit, 2019, 25: 3146-3153.
- [ 18 ] Shi S, Zheng S, Li XF, et al. The effect of estradiol on the growth plate chondrocytes of limb and spine from postnatal mice *in vitro*; the role of estrogen-receptor and estradiol concentration [ J ]. Int J Biol Sci, 2017, 13(1): 100-109.
- [ 19 ] Jiang L, Shen X, Wei L, et al. Effects of bisphosphonates on mandibular condyle of ovariectomized osteoporotic rats using micro-CT and histomorphometric analysis [ J ]. J Oral Pathol Med, 2017, 46(5): 398-404.
- [ 20 ] Xiao ZF, He JB, Su GY, et al. Osteoporosis of the vertebra and osteochondral remodeling of the endplate causes intervertebral disc degeneration in ovariectomized mice [ J ]. Arthritis Res Ther, 2018, 20(1): 207.
- [ 21 ] Svitkina T. The actin cytoskeleton and actin-based motility [ J ]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(1): a018267.
- [ 22 ] Svitkina TM. Ultrastructure of the actin cytoskeleton [ J ]. Curr Opin Cell Biol, 2018, 54: 1-8.
- [ 23 ] Rock MJ, Holden P, Horton WA, et al. Cartilage oligomeric matrix protein promotes cell attachment via two independent mechanisms involving CD47 and  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin [ J ]. Mol Cell Biochem, 2010, 338(1-2): 215-224.
- [ 24 ] Woods A, Wang G, Beier F. Regulation of chondrocyte differentiation by the actin cytoskeleton and adhesive interactions [ J ]. J Cell Physiol, 2007, 213(1): 1-8.
- [ 25 ] Li G, Song X, Li R, et al. Zyxin-involved actin regulation is essential in the maintenance of vinculin focal adhesion and chondrocyte differentiation status [ J ]. Cell Prolif, 2019, 52(1): e12532.
- [ 26 ] Lauer JC, Selig M, Hart ML, et al. Articular chondrocyte phenotype regulation through the cytoskeleton and the signaling processes that originate from or converge on the cytoskeleton: towards a novel understanding of the intersection between actin dynamics and chondrogenic function [ J ]. Int J Mol Sci, 2021, 22(6): 3279.
- [ 27 ] Killion CH, Mitchell EH, Duke CG, et al. Mechanical loading regulates organization of the actin cytoskeleton and column formation in postnatal growth plate [ J ]. Mol Biol Cell, 2017, 28(14): 1862-1870.
- [ 28 ] Wang Y, Zhang M, Huan Z, et al. FSH directly regulates chondrocyte dedifferentiation and cartilage development [ J ]. J Endocrinol, 2021, 248(2): 193-206.
- [ 29 ] Lefebvre V, Dvir-Ginzberg M. SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage [ J ]. Connect Tissue Res, 2017, 58(1): 2-14.
- [ 30 ] Wang G, Huang K, Dong Y, et al. Lycorine suppresses endplate-chondrocyte degeneration and prevents intervertebral disc degeneration by inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway [ J ]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(3): 1252-1269.

[ 收稿日期 ] 2022-01-19