

全反式维甲酸对骺软骨细胞生物学行为及其功能影响的研究

王霞^{1,2} 白昊笛^{1,2} 周尹² 刘星^{1*}

(¹重庆医科大学附属儿童医院骨科, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心(重庆), 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 重庆 400014; ²儿科学重庆市重点实验室, 重庆市干细胞治疗工程技术研究中心, 重庆 400014)

摘要 该研究主要探讨了体外高浓度全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)对SD大鼠骺软骨细胞生物学性状和功能的影响以及体内ATRA对SD大鼠胫骨生长板的影响。以SD大鼠骺软骨细胞为研究对象、ATRA为干预因素, 采用CCK-8、细胞流式术、HE染色、Annexin V-FITC细胞凋亡流式检测术、Hoechst染色、细胞划痕、Transwell实验分别评估ATRA处理后细胞的增殖、周期、形态、凋亡及迁移情况, Western blot检测蛋白聚糖、II型胶原、X型胶原等相关功能蛋白的变化; 以3周雄性SD大鼠为实验对象, 分为对照组、60 mg/kg·d ATRA组、80 mg/kg·d ATRA组, 进行10天连续ATRA灌胃处理, 测量每只SD大鼠灌胃第1天、第10天的头尾长, 处理10天后对胫骨生长板进行HE染色。结果表明, ATRA作用SD大鼠骺软骨细胞后, 增殖能力减弱且细胞周期被阻滞在S期($P<0.01$), 细胞形态由三角形、多边形变为长条状, 凋亡的发生增多($P<0.01$), 迁移能力受到抑制($P<0.05$)以及Western blot结果显示蛋白聚糖、II型胶原、X型胶原等功能相关蛋白较对照组表达均明显降低($P<0.01$); 对SD大鼠进行ATRA灌胃处理后, 与对照组比较, 60 mg/kg·d ATRA组和80 mg/kg·d ATRA组的头尾长均变短($P<0.01$); 胫骨生长板HE染色显示, ATRA灌胃组的生长板变窄甚至闭合。该研究证实了体外高浓度ATRA能够对SD大鼠骺软骨细胞的增殖、迁移起抑制作用, 同时能够诱导凋亡, 降低相关功能蛋白的表达, 在SD大鼠体内证实, 过量ATRA可影响生长板软骨内成骨过程, 最终使生长板部分或全部提前闭合, 进而影响SD大鼠身长的增长。

关键词 全反式维甲酸; 骺软骨细胞; 生物学行为; 生长发育

Effects of All-Trans Retinoic Acid on the Biological Behavior and Function of Epiphyseal Chondrocytes

WANG Xia^{1,2}, BAI Haodi^{1,2}, ZHOU Yin², LIU Xing^{1*}

(¹Department of orthopedics; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, National Clinical Research Center for Children Health and Diseases (Chongqing); China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders; Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; ²Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing Engineering Research Center of Stem Cell Therapy, Chongqing 400016, China)

Abstract This study investigated the effect of high concentration of ATRA (all-trans retinoic acid) *in vitro* on the biological characteristics and function of epiphyseal cartilage cells in SD rats and the effect of ATRA *in vivo*

收稿日期: 2019-09-16 接受日期: 2019-11-07

重庆市科委基础与前沿探索一般项目(批准号: cstc2018jcyjA0451、cstc2016shmszx0548)资助的课题

*通讯作者。Tel: 17338332267, E-mail: liuxingda@126.com

Received: September 16, 2019 Accepted: November 7, 2019

This work was supported by Chongqing Science and Technology Commission Basic and Frontier Exploration General Project (Grant No.cstc2018jcyjA0451, cstc-2016shmszx0548)

*Corresponding author. Tel: +86-17338332267, E-mail: liuxingda@126.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5175>

on tibia growth plate in SD rats. The epiphyseal chondrocytes of SD rats were studied and ATRA was used as the intervention factor. CCK-8, cytometry, HE staining, Annexin V-FITC apoptosis flow cytometry, Hoechst staining, cell scratches and Transwell experiment were used to evaluate the cell proliferation, cycle, morphology, apoptosis and migration after ATRA treatment. The changes of proteoglycan, collagen-II and collagen-X related functional proteins were detected by Western blot. Male SD rats at 3-weeks were divided into control group, 60 mg/kg·d ATRA group and 80 mg/kg·d ATRA group for continuous gavage for 10 days. The length of the head and tail of each SD rat was measured on the first day and the tenth day of gavage, and the tibia growth plate was stained with HE after 10 days of treatment. The results showed that, compared with the control group, the proliferation ability was weakened and the cell cycle was blocked in S phase ($P<0.01$). Compared with the control group, the occurrence of apoptosis increased ($P<0.01$) and the migration ability was inhibited ($P<0.05$). Western blot results showed that the expressions of proteoglycan, collagen-II and collagen-X were significantly lower than those of the control group ($P<0.01$). Compared with the control group, the head and tail length of the ATRA treatment group were all shorter ($P<0.01$). HE staining of tibia growth plate showed that the growth plate in the ATRA gavage group was narrowed or even closed. This study confirmed that high concentration of ATRA could inhibit cell proliferation, inhibit cell migration, induce cell apoptosis, and reduce the expression of related functional proteins. Excessive ATRA has been shown to affect the endochondral osteogenesis of growth plates in SD rats. Finally, ATRA caused the epiphyseal plate to be partially or completely closed in advance, thus affecting the growth of body length of SD rats.

Keywords all-trans retinoic acid; biological behavior; epiphyseal chondrocytes; growth and development

骺板, 也被称为生长板, 是儿童所特有的结构, 也是生长期骨骼的生长发育重要部位。骺软骨细胞的增殖、肥大、凋亡等一系列事件决定着骨骼纵向生长潜能^[1-3], 当骺板因各种内外因素损伤后, 儿童成年后的身高将受到影响, 还有可能出现畸形^[4-5]。全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)是动物体内维生素A代谢的中间产物, 也是维生素A生物活性最强的一种存在形式, 在脊椎动物生长、发育和细胞分化有重要作用。维生素A易于吸收、清除率低、半衰期长^[6], 当其摄入过量将长时间维持较高血药浓度, 而骨骼则是对维生素A毒性敏感的组织^[7]。

有动物实验证实, ATRA可以破坏肢体软骨的形态形成^[8]; 也有个案显示, 全反式维甲酸在治疗儿童血液疾病时患儿出现身高停止增长的现象^[9]; 那么 ATRA是否是造成身高停止增长的原因之一呢? 所以本实验拟探究体外高浓度 ATRA 对 SD 大鼠骺软骨细胞生物学行为和功能的影响以及在过量 ATRA 灌胃后 SD 大鼠体内胫骨生长板的情况, 以期望提高对维生素 A 及 ATRA 治疗的相关认识, 避免因过量补充带来的不良影响。

1 材料与方法

1.1 材料

全反式维甲酸(ATRA)购自美国Sigma公司; SD大鼠骺软骨细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司; DMEM-basic(1×) F12培养基、青链霉素、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶均购自美国Gibco公司; CCK-8试剂盒购自日本同仁公司; 苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色试剂盒购自北京雷根生物技术有限公司; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自北京欣博盛生物科技有限公司; Hoechst 33342、结晶紫染色剂、Western blot一抗快速封闭液、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE电泳液以及转膜液均购自上海碧云天生物技术有限公司; PBS、Transwell小室、DNA含量检测试剂盒(细胞周期)购自北京索来宝科技有限公司; 兔源蛋白聚糖(aggrecan)抗体购自沈阳万类生物科技有限公司; 兔源II型胶原(collagen-II)抗体购自美国Gene Tex公司; 兔源X型胶原(collagen-X)抗体购自广东正博生物科技有限公司; 鼠源 β -actin抗体、羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗均购自美国Santa Cruz Animal Health生物技术公司; 27只3周龄雄性

Sprague-Dawley大鼠(SD大鼠)购自重庆医科大学实验动物中心[动物许可号: SYXK(渝)2007-0001]。

1.2 细胞培养

SD大鼠髂软骨细胞培养于DMEM-basic(1×) F12培养基中, 内含10%胎牛血清及100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素, 置于37 °C、5.0% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。

1.3 CCK-8法检测细胞增殖能力

取对数生长期SD大鼠髂软骨细胞, 以 5×10^4 个/mL的密度接种于96孔板, 每孔100 μL, 置于培养箱中培养24 h后加药。药物终浓度分别为10、20、30、40 μmol/L, 对照组加入等体积培养基。于12 h、24 h、36 h、48 h、60 h时每孔加10 μL CCK-8处理3 h, 然后酶标仪测其450 nm处的吸光度(D)值, 对照组和实验组均设6个复孔。

1.4 流式细胞术检测细胞周期

取对数生长期的SD大鼠髂软骨细胞, 按6 cm培养皿底面积30%的密度接种培养48 h后加药, 药物浓度为30 μmol/L, 对照组加入等体积的完全培养基放入37 °C孵箱培养24 h; 消化细胞后1 000 r/min离心3 min, PBS洗涤1次, 1 000 r/min离心3 min收集细胞, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 用70%预冷乙醇500 μL于4 °C固定细胞24 h; PBS洗1次后加入100 μL RNase A溶液重悬细胞, 37 °C水浴30 min; 再加入400 μL碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色液混匀, 4 °C避光孵育30 min, 最后上流式细胞仪进行检测分析。

1.5 细胞爬片HE染色检测细胞形态变化

取对数生长期的SD大鼠髂软骨细胞, 按24孔板底面积30%的密度接种, 培养48 h后加药, 药物浓度为30 μmol/L, 对照组加入等体积的完全培养基放入37 °C孵箱培养24 h; PBS洗3次, 4%多聚甲醛固定30 min后PBS洗3次; 苏木素染15 min, 自来水冲洗1 min, 伊红染8 min后自来水冲洗1 min, 晾干封片。

1.6 Annexin V-FITC和Hoechst法检测细胞凋亡

1.6.1 Annexin V-FITC法检测细胞的凋亡能力 取对数生长期的SD大鼠髂软骨细胞, 按6 cm培养皿底面积30%的密度接种, 培养48 h后加含30 μmol/L ATRA的完全培养基, 对照组加入等体积的完全培养基放入37 °C孵箱培养24 h; 消化细胞后1 000 r/min离心3 min, 用PBS洗涤细胞2次, 用200 μL结合缓冲液重新悬浮细胞并使其浓度为 3×10^4 个/mL; 取200 μL的细胞悬液加入5 μL Annexin V-FITC, 混匀后室温避光

孵育10 min后加入10 μL浓度为20 μg/mL PI溶液; 混匀后上流式细胞仪进行检测分析。

1.6.2 Hoechst法检测细胞的凋亡能力 将24孔爬片置于24孔板内备用; 取对数生长期的SD大鼠髂软骨细胞, 按24孔板底面积50%的密度接种, 培养24 h后加含30 μmol/L ATRA的完全培养基, 对照组加入等体积的完全培养基放入37 °C孵箱培养, 处理24 h后4%多聚甲醛固定30 min, PBS洗3次, 每孔加200 μL Hoechst 33342染色剂避光染色15 min; 于载玻片上滴加抗荧光淬灭剂, 将24孔爬片细胞面盖在上面后荧光显微镜拍照。

1.7 划痕法和Transwell法检测细胞的迁移能力

1.7.1 划痕法 取对数生长期的SD大鼠髂软骨细胞, 按6孔板底面积30%的密度接种, 每孔3 mL, 培养48 h后用移液管尖在每孔底部中间划一窄线, PBS洗3次后加入终浓度为30 μmol/L的ATRA, 对照组加入等体积的完全培养基。药物处理0、12、24、36 h后置细胞培养板于倒置显微镜下观察拍照。

1.7.2 Transwell法 将Transwell小室置于24孔板内, 消化、离心后计数细胞; 用无血清培养基稀释细胞, 按 3×10^4 个/孔的细胞加入Transwell上室, 同时在Transwell下室加入含10% FBS的培养基600 μL, 放入37 °C孵箱培养; 于12 h后将Transwell下室换成含30 μmol/L ATRA的完全培养基, 对照组加入等体积的完全培养基, 处理24 h后4%多聚甲醛固定30 min, PBS洗3次, 每孔加200 μL结晶紫染色20 min, 然后用棉签擦拭Transwell小室内膜上的细胞, 显微镜下拍照后每孔加500 μL无水乙醇避光置于摇床上30 min, 最后将其每孔液体平均加到96孔板内测其570 nm处的吸光度值。

1.8 Western blot检测相关蛋白表达含量

配制10% SDS-PAGE, 每孔加30 μg蛋白样品; 使用半干转法电转至PVDF膜, Western blot一抗快速封闭液室温封闭15 min, 1:500 TBST稀释一抗, 4 °C过夜; 加入辣根过氧化酶标记山羊抗兔IgG(1:2 000)稀释, 室温孵育1 h; 滴加化学发光剂(electrochemiluminescence, ECL)在显影仪上进行显影。

1.9 测量SD大鼠检测头尾长和生长板变化

1.9.1 测量SD大鼠头尾长 在灌胃第1天和第10天将对照组、60 mg/kg·d ATRA组、80 mg/kg·d ATRA组的SD大鼠麻醉, 使其头尾尽量保持在一条直线上, 用直尺测量头尾长并拍照。

1.9.2 HE染色检测ATRA处理后SD大鼠生长板厚度变化 选取27只3周龄雄性SD大鼠, 分为3组(对照组、60 mg/kg·d ATRA组、80 mg/kg·d ATRA组), 每组9只, 进行10天连续灌胃处理, 灌胃第10天后取SD大鼠胫骨上端再浸泡于4 %多聚甲醛中7天, 然后脱水、包埋、切片、HE染色, 拍照。

1.10 统计学分析

所有实验重复3次, 结果采用SPSS 20统计软件及GraphPad Prism 6进行分析, 均值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析和 t 检验, $*P < 0.05$ 为差异有显著性, $**P < 0.01$ 为差异有极显著性。

2 结果

2.1 ATRA抑制SD大鼠髌软骨细胞的增殖

取10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ 的ATRA分别处理SD大鼠髌软骨细胞后, 于12 h、24 h、36 h、48 h、60 h行CCK8检测, 结果(图1)显示: 随着ATRA处理浓度的增加, 对细胞增殖抑制作用越明显; 同时随着处理时间的延长其抑制作用也越明显, 即ATRA对SD大鼠髌软骨细胞的增殖抑制存在浓度和时间依赖性。以 IC_{50} 为ATRA处理髌软骨细胞的中间浓度, 选取大于 IC_{50} 的30 $\mu\text{mol/L}$ 作为高浓度ATRA进行后续实验。

2.2 高浓度ATRA处理SD大鼠髌软骨细胞使细胞周期阻滞于S期

采用流式细胞术检测正常大鼠髌软骨细胞和30 $\mu\text{mol/L}$ ATRA处理24 h的SD大鼠髌软骨细胞的周期分布(图2)可知, 未经ATRA处理的SD大鼠髌软骨细胞

绝大部分在 G_1 期($94.81\% \pm 0.49\%$), S期($1.35\% \pm 0.10\%$)细胞较少; 与对照组比较, ATRA处理后的SD大鼠髌软骨细胞, G_1 期($89.09\% \pm 0.71\%$)细胞减少($P < 0.05$), S期($6.46\% \pm 0.43\%$)细胞增多($P < 0.01$), 结合CCK-8结果提示, ATRA处理后细胞周期阻滞于S期。

2.3 高浓度ATRA改变SD大鼠髌软骨细胞的形态

对照组SD大鼠髌软骨细胞和30 $\mu\text{mol/L}$ ATRA处理24 h的SD大鼠髌软骨细胞进行HE染色后结果(图3)显示: 对照组髌软骨细胞呈三角形、多角形, 而ATRA处理的髌软骨细胞形态发生变化, 多呈现长条状、纤维状。由此可知, ATRA可改变SD大鼠髌软骨细胞的形态。

2.4 高浓度ATRA诱导SD大鼠髌软骨细胞凋亡的发生

Annexin V-FITC细胞流式实验结果显示, ATRA以浓度30 $\mu\text{mol/L}$ 处理SD大鼠髌软骨细胞24 h后, 与空白对照组相比, 处理组的细胞凋亡率($6.53\% \pm 1.01\%$)高于对照组($2.99\% \pm 0.29\%$), 差异具有统计学意义($P < 0.01$)(图4); 进一步Hoechst染色后结果显示, 凋亡细胞的核固缩呈浓染, 并且有核偏移、碎裂等现象(图5)。

2.5 高浓度ATRA抑制SD大鼠髌软骨细胞的迁移作用

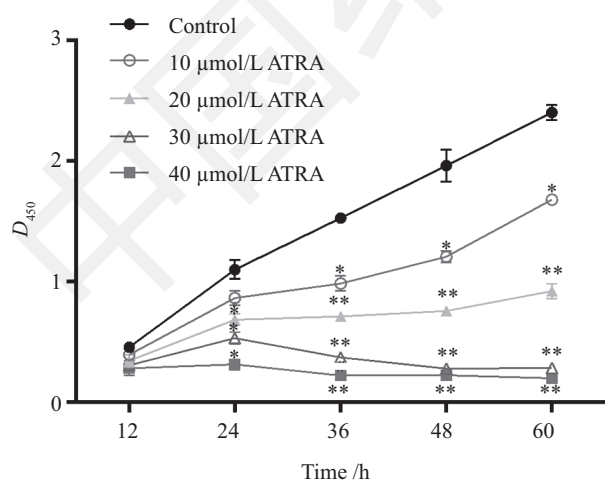
SD大鼠髌软骨细胞贴壁生长24 h后, 用1 mL枪头紧靠直尺进行划痕, 加入30 $\mu\text{mol/L}$ ATRA继续培养12 h、24 h和36 h后观察细胞的迁移情况。如图6所示, ATRA处理组细胞较对照组细胞迁移明显减慢, Transwell迁移实验结果(图7)显示, 30 $\mu\text{mol/L}$ ATRA处理组细胞迁移数量较对照组明显减少($P < 0.01$)。

2.6 Western blot检测aggrecan、collagen-II、collagen-X的表达

Western blot结果表明, 与空白对照组比较, ATRA以浓度10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 作用SD大鼠髌软骨细胞24 h后, aggrecan、collagen-II、collagen-X的表达较对照组均降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图8)。

2.7 ATRA处理后SD大鼠头尾长和生长板的变化

对照组、60 mg/kg·d ATRA组和80 mg/kg·d ATRA组的生存率分别为100%、100%和66.67%, 80 mg/kg·d ATRA组的生存率降低, 说明80 mg/kg·d ATRA已经达到致死量; 如图9所示, 与对照组比较, 60 mg/kg·d ATRA组和80 mg/kg·d ATRA组的头尾长均变短($P < 0.01$); HE结果(图10)显示: 与对照组比较,

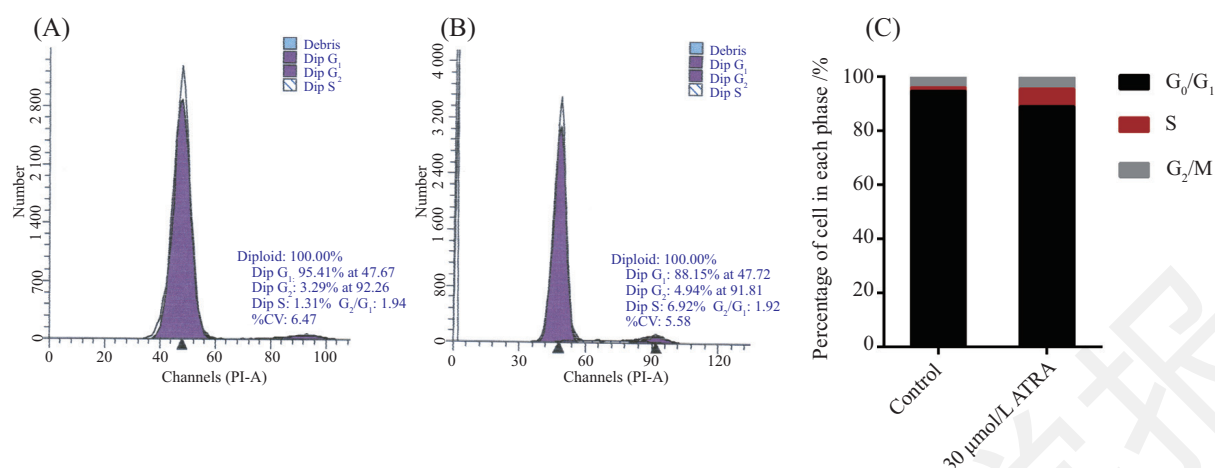


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the control group.

图1 各组细胞的增殖能力变化

Fig.1 Cell proliferation rates of different groups

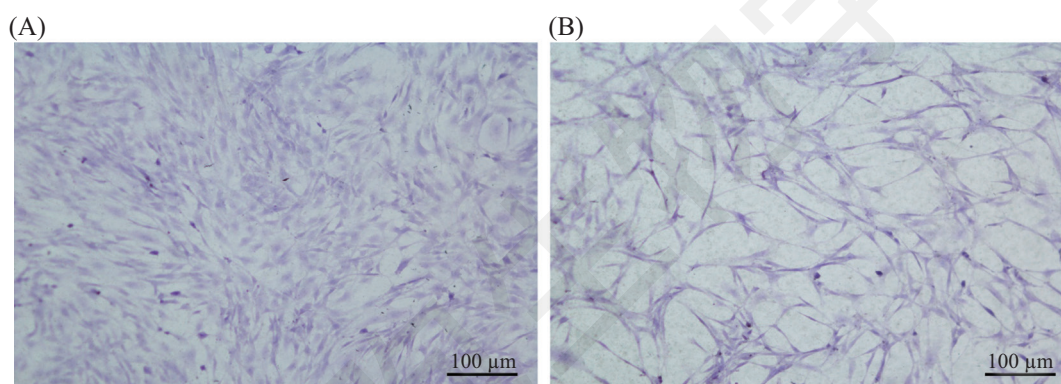


A: 对照组流式细胞周期图; B: 30 μmol/L ATRA处理组流式细胞周期图; C: 周期分布统计图。

A: flow cycle diagram of control group; B: flow cycle diagram of treatment group with 30 μmol/L ATRA; C: statistical chart of periodic distribution.

图2 SD大鼠髌软骨细胞的细胞周期变化

Fig.2 Changes of epiphyseal cartilage cell cycle in SD rats

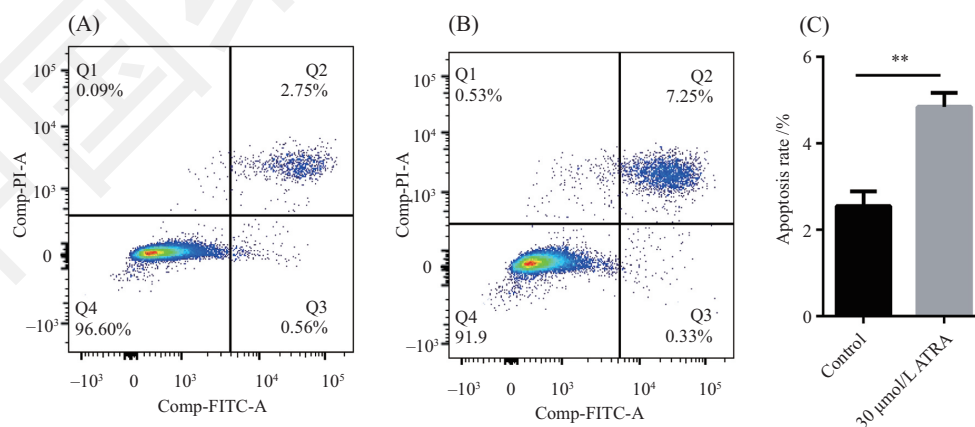


A: 对照组细胞形态图; B: 30 μmol/L ATRA处理组细胞形态图。

A: cell morphology of control group; B: cell morphology of treatment group with 30 μmol/L ATRA.

图3 细胞形态变化

Fig.3 Changes in cell morphology



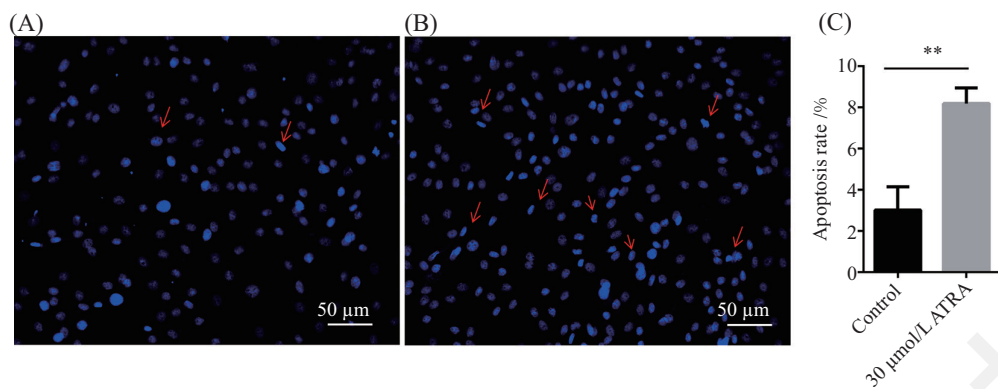
A: 对照组流式凋亡图; B: 30 μmol/L ATRA处理组流式凋亡图; C: 流式凋亡统计图。 **P<0.01。

A: flow diagram of apoptosis in the control group; B: flow diagram of apoptosis in group treated with 30 μmol/L ATRA; C: flow statistics of apoptosis.

**P<0.01.

图4 流式细胞术检测ATRA对SD大鼠髌软骨细胞凋亡的影响

Fig.4 Effects of ATRA on epiphyseal chondrocyte apoptosis in SD rats with flow cytometry

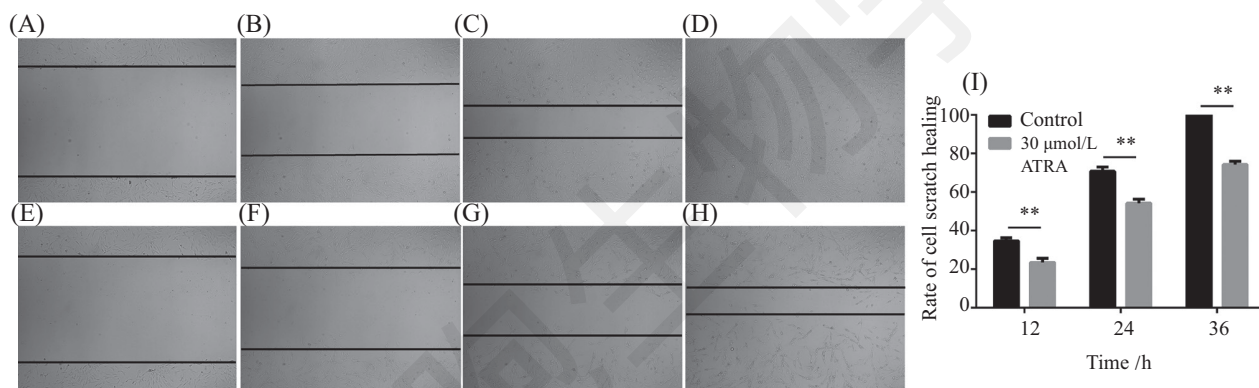


A: 对照组Hoechst染色图; B: 30 μmol/L ATRA处理组Hoechst染色图; C: Hoechst染色凋亡统计图。红色箭头所示为凋亡细胞的细胞核; ** $P<0.01$ 。

A: Hoechst staining of control group; B: Hoechst staining of treatment group with 30 μmol/L ATRA; C: Hoechst staining apoptosis statistics. The red arrow shows the nucleus of an apoptotic cell; ** $P<0.01$.

图5 Hoechst检测ATRA对SD大鼠髌软骨细胞凋亡的影响

Fig.5 Effects of ATRA on epiphyseal chondrocyte apoptosis in SD rats with hoechst

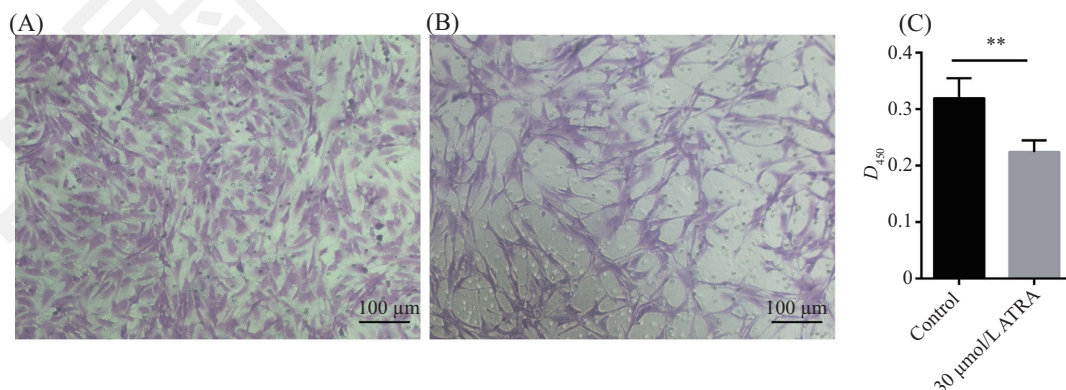


A~D: 对照组0、12、24、36 h的划痕图; E~H: 30 μmol/L ATRA处理组0、12、24、36 h的划痕图; I: 划痕愈合率统计图。 ** $P<0.01$ 。

A~D: the scratches of the control group at 0, 12, 24 and 36 h; E~H: scratches of 30 mol/L ATRA treatment group at 0, 12, 24 and 36 h; I: statistical chart of scratch healing rate. ** $P<0.01$.

图6 ATRA对SD大鼠髌软骨细胞迁移的影响

Fig.6 Effects of ATRA on epiphyseal chondrocyte migration in SD rats

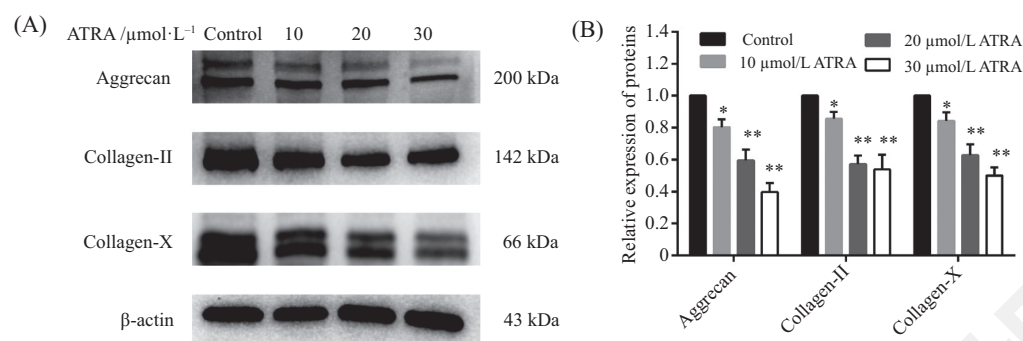


A: 对照组Transwell迁移图; B: 30 μmol/L ATRA处理组Transwell迁移图; C: Transwell迁移吸光度统计图。 ** $P<0.01$ 。

A: Transwell diagram of control group; B: Transwell transfer diagram of treatment group with 30 μmol/L ATRA; C: Transwell transfer absorbance statistics. ** $P<0.01$.

图7 Transwell实验检测细胞的迁移能力

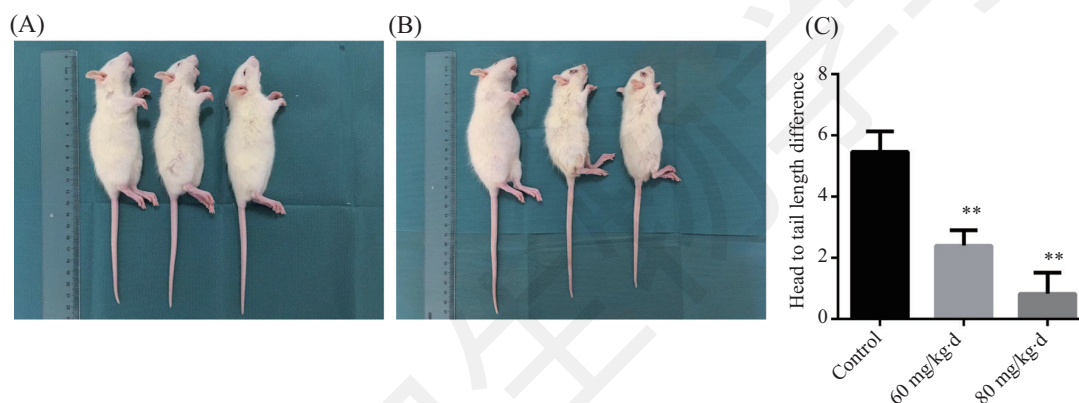
Fig.7 Transwell assay assayed the migration ability of cells



A: Western blot检测各组细胞蛋白表达; B: A图蛋白表达水平量化图。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较。

A: Western blot detection of protein expression in each group; B: figure A quantitative diagram of protein expression level. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the control group.

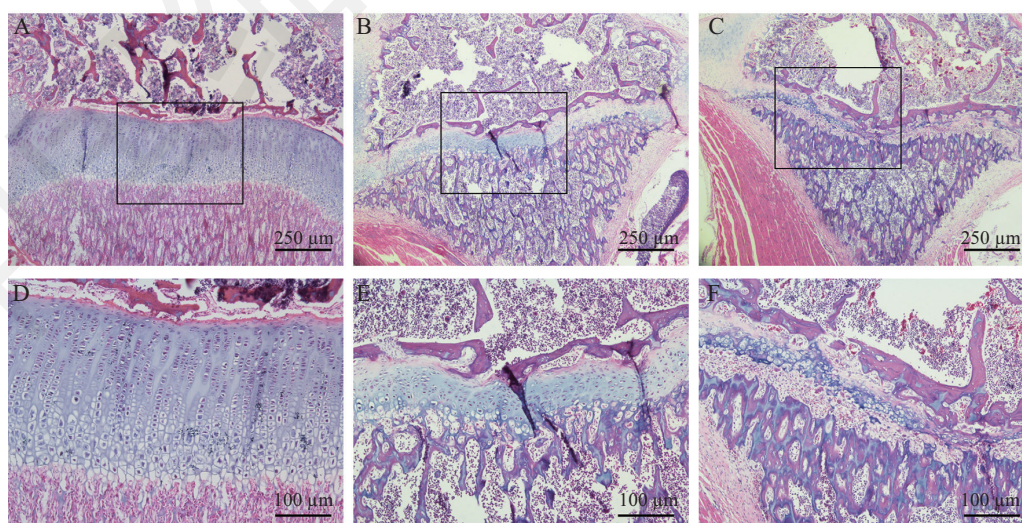
图8 Western blot检测Aggrecan、Collagen-II、Collagen-X的表达
Fig.8 Expression of Aggrecan, Collagen-II, Collagen-X with Western blot



A、B: SD大鼠灌胃第1天和第10天时对照组、60 mg/kg·d ATRA组、80 mg/kg·d ATRA组的大体对比图; C: 头尾长统计图。** $P < 0.01$, 与对照组比较。

A,B: general comparison of the control group, 60 mg/kg·d ATRA group and 80 mg/kg·d ATRA group on the first and 10th day of gavage of SD rats; C: head and tail length statistics. ** $P < 0.01$ compared with the control group.

图9 SD大鼠头尾长变化
Fig.9 Changes of head and tail length in SD rats



A~C: 对照组、60 mg/kg·d ATRA组、80 mg/kg·d ATRA组生长板的HE染色图; D~F: A~C黑色方框中放大图。

A-C: HE staining of growth plates of control group, 60 mg/kg·d ATRA group and 80 mg/kg·d ATRA group; D-F: the picture of the black box in A-C.

图10 SD大鼠生长板厚度变化
Fig.10 Growth plate thickness changes in SD rats

60 mg/kg·d ATRA 灌胃后的SD大鼠胫骨生长板的增殖带、肥大带均变窄, 而80 mg/kg·d ATRA灌胃后的SD大鼠胫骨生长板几乎闭合。

3 讨论

随着人们生活水平的不断提高, 维生素A缺乏的情况在高速发展中的国家已经明显得到改善, 而维生素A过量的情况却悄然而至^[10-12]。从临床使用角度来看, 目前预防性补充维生素A强化品或鱼肝油(主要成分是维生素A和维生素D)的现象日益增多^[13-15]。国内外已有过量使用维生素A和维生素A衍生物ATRA影响骨骼钙磷代谢^[16]、下肢关节畸形^[17]、脊椎畸形^[18]的报道, 而本研究也验证了过量维生素A与儿童的身高停止增长存在一定的关系。

身高增长是骨骼的纵向生长的结果, 而骨骼的纵向生长依赖于生长板内不断地软骨内成骨^[19], 骺板软骨从解剖上分为三带: 静止带、增殖带、肥大带^[20], 骨骼的纵向生长与生长板的总厚度、增殖带厚度、肥大带厚度有关^[21]。增殖带软骨细胞是静止带软骨细胞经过不断分裂增殖沿骨长轴形成多行并列的纵行“软骨细胞柱”^[22]。在本研究中ATRA处理SD大鼠骺软骨细胞后细胞周期S期增加, 可能是由于ATRA影响了细胞周期的正常进程, 使得S期进入G₂期受阻, 进而影响了细胞的增殖能力, 这就提示ATRA可以降低增殖带厚度。肥大带软骨细胞由增殖带软骨细胞分化而来, 体积明显增大^[23], 对于骨骼生长发育阶段, 9%生长源于增殖, 32%生长源于基质合成, 59%源于细胞增大, 所以肥大带软骨细胞分化是骨骼纵向生长的推动力^[24], 而X型胶原是肥大软骨细胞分化成熟的标志物^[25], ATRA可能通过降低X型胶原表达进而阻碍肥大带软骨细胞的肥大过程使生长板上的肥大带厚度变窄。ATRA诱导骺软骨细胞凋亡的发生加速了生长板的骨化速度, 使得生长板的总厚度、增殖带厚度、肥大带厚度均可受到影响。有研究发现ATRA可以破坏胎儿髌软骨细胞的增殖和分化, 这与本研究结果ATRA抑制骺软骨细胞的增殖、分化, 促进凋亡相一致^[26]。细胞迁移对于细胞和组织的形态发生以及功能修复是必不可少的^[27], ATRA使生长板各带之间的细胞迁移速度减慢, 可能影响了各带骺软骨细胞发挥其正常功能, 甚至导致畸形的发生。蛋白聚糖和II型胶原是评价软骨功能的主要指标, 蛋白聚糖使软骨具有一定的弹

性, 同时维持软骨形状, 承载外来负荷, II型胶原提供了软骨特有的张力和硬度, ATRA作用于骺软骨细胞后蛋白聚糖和II型胶原表达的降低导致生长板失去原有的弹性和硬度, 使得更易发生骨质疏松, 从而可能影响骨骼的纵向生长。在SD大鼠体内进行过量ATRA灌胃后, HE染色的胫骨生长板部分或完全闭合, 进一步验证了过量ATRA影响身高的增长。

生长激素(growth hormone, GH)和甲状腺激素(thyroid hormone, TH)是促进骨骼生长最主要两种激素。研究发现, ATRA可刺激垂体前叶细胞生长激素基因表达^[28], 这与本研究的结果相悖, 可能是由于骨骼的纵向生长是多因素共同调控的结果, 也有可能是本实验采用过量ATRA负反馈作用生长激素轴上而减少生长激素的分泌, 具体机制需要在下一步实验中进行验证。也有研究发现, 全反式维甲酸可能影响下丘脑-垂体-甲状腺轴, 引起中枢甲状腺功能的减退^[29], 甲状腺分泌甲状腺激素的减少而影响骨骼的生长, 与本研究相符。

综上所述, 高浓度ATRA对SD大鼠骺软骨细胞有较强的生长和迁移抑制作用, 并且改变了其细胞形态和诱导其凋亡的发生。功能蛋白的降低提示, ATRA可能会通过对骺软骨细胞的功能抑制继而导致骨骼的生长发育异常。本研究可以为新药开发和临床用药提供一些实验依据, 也为儿童日常生活中长期过度使用含维生素A的保健品和含ATRA的药品敲响警钟。

参考文献 (References)

- [1] PROVOT S, SCHIPANI E. Molecular mechanisms of endochondral bone development [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328(3): 658-65.
- [2] KARP S J, SCHIPANI E, ST-JACQUES B, et al. Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways [J]. *Development*, 2000, 127(3): 543-8.
- [3] KINDBLOM J M, NILSSON O, HURME T, et al. Expression and localization of Indian hedgehog (Ihh) and parathyroid hormone related protein (PTHrP) in the human growth plate during pubertal development [J]. *J Endocrinol*, 2002, 174(2): 1-6.
- [4] MCCARTY R C, XIAN C J, GRONTHOS S, et al. Application of autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells to an ovine model of growth plate cartilage in injury [J]. *Open Orthop J*, 2010, 4: 204-10.
- [5] EASTWOOD D M, GHELDERE A D. Physeal injuries in children [J]. *Surgery (Oxford)*, 2011, 29(4): 146-52.
- [6] LIONIKAITE V, GUSTAFSSON K L, WESTERLUN D A, et al. Clinically relevant doses of vitamin A decrease cortical bone

- mass in mice [J]. *J Endocrinol*, 2018, 239(3): 389-402.
- [7] TANUMIHARDJO S A. Vitamin A and bone health: the balancing act [J]. *J Clin Densitom*, 2013, 16(4): 414-9.
- [8] EIZO M, KOTA S, KENJI M, et al. A newly established culture method highlights regulatory roles of retinoic acid on morphogenesis and calcification of mammalian limb cartilage [J]. *Bio-techniques*, 2015, 58(6): 318-24.
- [9] NOYES JJ, LEVINE MA, BELASCO JB, et al. Premature epiphyseal closure of the lower extremities contributing to short stature after cis-retinoic acid therapy in medulloblastoma: a case report [J]. *Horm Res Paediatr*, 2016, 85(1): 69-73.
- [10] 李俊, 郑春梅, 倪君君, 等. 2013—2016年北京地区孕妇维生素A、维生素E营养水平[J]. *卫生研究*(LI J, ZHENG C, NI J, et al. Trend of vitamin A and vitamin E among pregnancy of Beijing in 2013-2016 [J]. *Journal of Hygiene Research*), 2019, 48(1): 56-60.
- [11] JAYATISSA R, FERNANDO D N. Supplementation of micronutrients in children and food fortification initiatives in Sri Lanka: benefits versus risks [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2019, 1446(1): 139-52.
- [12] CHANG C H, LU C W, CHUNG W H, et al. Acute fish liver intoxication induced blisters formation and generalized skin peeling [J]. *Clin Toxicol (Phila)*, 2017, 56(2): 1-3.
- [13] HOMMA Y, OTANI N, ISHIMATSU S. A case report of acute vitamin a intoxication due to ocean perch liver ingestion [J]. *J Emerg Med*, 2015, 49(1): 15-7.
- [14] GARCIA-CORTES M, ROBLES-DIAZ M, AIDA O A, et al. Hepatotoxicity by dietary supplements: a tabular listing and clinical characteristics [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 537-60.
- [15] MAROSZ A, CHLUBEK D. The risk of abuse of vitamin supplements [J]. *Ann Acad Med Stetin*, 2014, 60(1): 60-4.
- [16] LIU R H, KANG X, XU L P, et al. Effects of the combined extracts of *Herba Epimedii* and *Fructus Ligustri Lucidi* on bone mineral content and bone turnover in osteoporotic rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15(1): 1-8.
- [17] SASS J O, ZIMMERMANN B, RUHL R, et al. Effects of all-trans-retinoyl-beta-D-glucuronide and all-trans-retinoic acid on chondrogenesis and retinoid metabolism in mouse limb bud mesenchymal cells *in vitro* [J]. *Arch Toxicol*, 1997, 71(3): 142-50.
- [18] IBARAKI H, WU X, UJI S, et al. Transcriptome analysis of vertebral bone in the flounder, *Paralichthys olivaceus* (Teleostei, *Pleuronectiformes*), using illumina sequencing [J]. *Mar Genomics*, 2015, 24(3): 269-76.
- [19] KRONENBERG G, HENRY M. Developmental regulation of the growth plate [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 332-6.
- [20] LUI J C, YUE S, LEE A, et al. Persistent Sox9 expression in hypertrophic chondrocytes suppresses transdifferentiation into osteoblasts [J]. *Bone*, 2019, 125: 169-77.
- [21] SCHRIER L, FERNS S P, BARNES K M, et al. Depletion of resting zone chondrocytes during growth plate senescence [J]. *J Endocrinol*, 2006, 189(1): 27-36.
- [22] NILSSON O, MARINO R, DELUCA F, et al. Endocrine regulation of the growth plate [J]. *Horm Res*, 2005, 64(4): 157-65.
- [23] SUN M M, BEIER F. Chondrocyte hypertrophy in skeletal development, growth, and disease [J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2014, 102(1): 74-82.
- [24] SILVESTRINI G, MOCETTI P, BALLANTI P, et al. Cytochemical demonstration of the glucocorticoid receptor in skeletal cells of the rat [J]. *Endocr Res*, 1999, 25(1): 117-28.
- [25] HE Y, SIEBUHR A S, BRANDT-HANSEN N U, et al. Type X collagen levels are elevated in serum from human osteoarthritis patients and associated with biomarkers of cartilage degradation and inflammation [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2014, 15(1): 309-19.
- [26] LI N, XU Y, ZHANG H, et al. Excessive retinoic acid impaired proliferation and differentiation of human fetal palatal chondrocytes (hFPCs) [J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2014, 101(3): 276-82.
- [27] FRIEDL P, WOLF K. Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2009, 28(1/2): 129-35.
- [28] MALIZA R, FUJIWARA K, TSUKADA T, et al. Effects of retinoic acid on growth hormone-releasing hormone receptor, growth hormone secretagogue receptor gene expression and growth hormone secretion in rat anterior pituitary cells [J]. *Endocr J*, 2016, 63(6): 555-61.
- [29] ANGIONI A R, LANIA A, CATTANEO A, et al. Effects of chronic retinoid administration on pituitary function [J]. *J Endocrinol Invest*, 2005, 28(2): 961-4.