

塞来昔布对人成骨细胞增殖的影响及其作用机制

高 杰 桂斌捷 胡孔足 王斯晟

摘要 目的 观察塞来昔布对人成骨细胞增殖的影响及其作用机制。方法 将人成骨细胞分为3组:空白对照组、IL-1 刺激组(阴性对照组)、塞来昔布+IL-1 刺激组(药物干预组),用 RT-PCR 法和 Western blot 法分别检测三组成骨细胞环氧化酶-2(COX-2)、膜相关前列腺素 E2 合成酶 1(mPGES-1) mRNA 和蛋白的表达。MTT 法检测塞来昔布对阴性对照组人成骨细胞增殖的影响。结果 RT-PCR 法和 Western blot 法实验结果显示,同空白对照组相比,阴性对照组的人成骨细胞中 COX-2、mPGES-1 mRNA 和蛋白的表达均增加;同阴性对照组相比,药物干预组的 COX-2、mPGES-1 mRNA 和蛋白的表达均降低。塞来昔布对 IL-1 刺激的人成骨细胞的生长具有抑制作用,呈现剂量依赖性,浓度越大,抑制作用越大;并且随着作用时间的延长,细胞的抑制作用增大。结论 塞来昔布可以抑制炎症状态下人成骨细胞的生长,可能是通过调控 COX-2、mPGES-1 mRNA 和蛋白的表达,使其表达下调而发挥作用。

关键词 环氧化酶-2;塞来昔布;成骨细胞;异位骨化

中图分类号 R 681.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0608-04

异位骨化是指在软组织出现成骨细胞,并形成骨组织。研究^[1-2]表明环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)和膜相关前列腺素 E2 合成酶(membrane-associated PGE2 synthase, mPGES-1)是花生四烯酸生成前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2)过程的重要催化酶,PGE2 可以让原始的间充质干细胞诱导分化成成骨细胞,促进成骨细胞的生长,并能调节破骨细胞的分化 and 功能,提示 COX-2 和 mPGES-1 可能对异位骨化的形成发挥重要作用。研究^[3-4]表明 IL-1 能够刺激人成骨细胞的 COX-2 及 mPGES-1 的表达,参与细胞病理及炎症过程。该研究用 COX-2 选择性抑制剂塞来昔布抑制 COX-2 和 mPGES-1 的表达,减少 PGE2 的生成,研究塞来昔布在炎症状态下对成骨细胞中 COX-2、mPGES-1 mRNA 和蛋白表

达的影响,同时观察不同浓度的塞来昔布对炎症状态下成骨细胞增殖的影响,探讨 COX-2 和 mPGES-1 对成骨细胞增殖分化的作用和对异位骨化可能的影响,旨在为临床预防和治疗异位骨化提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人成骨细胞购自中科院上海细胞库;塞来昔布购自中国辉瑞制药有限公司;无水乙醇溶液、氯仿、异丙醇、甲醇溶液、甘氨酸均购自上海国药集团;白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、DMEM 高糖培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自杭州四季青生物材料有限公司;胰蛋白酶购自上海碧云天生物技术有限公司。PBS 为本实验室自己配置,TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 生物公司,逆转录试剂盒及 RT-PCR 试剂盒均购自 Sigma 生物试剂公司;COX-2 和 mPGES-1 单抗均购自美国 Proteintech Group 公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)和鼠、兔二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Marker 购自美国 Thermo Scientific 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自原平皓生物技术有限公司。

1.2 主要仪器 稳压稳流蛋白电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司;ELX-800 型光吸收酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司;PCR 扩增仪购自德国 Biomatra 公司;凝胶密度扫描仪、紫外投射仪均购自上海 Tanon 科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人成骨细胞培养于 DMEM 培养液(90%)和胎牛血清(10%)混合培养基中贴壁生长,在 5% CO₂、37℃ 的温箱中培养。2~3 d 传代一次,使保持细胞处于对数生长期。

1.3.2 RT-PCR 法检测塞来昔布对成骨细胞增殖的影响 实验将处于对数生长期的人成骨细胞用胰酶消化后,用 DMEM 培养基配制成细胞密度为 1 × 10⁵ 个/ml 的细胞悬液分别加入到 6 孔板中,待细胞贴壁后将其分为 3 组:空白对照组、IL-1 刺激组(阴性对照组)、塞来昔布+IL-1 刺激组(药物干预组),IL-1 的浓度为 10 ng/ml,塞来昔布的浓度为 20

2015-03-09 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1408085MH182)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院骨科,合肥 230000

作者简介:高 杰,男,硕士研究生;

桂斌捷,男,教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者;E-

mai: guibinjie12@163.com

$\mu\text{mol/L}$ 处理 24 h 后 取出处理的人成骨细胞 弃培养液 加 PBS 轻轻地洗涤 3 遍 吸净 PBS 加入 TRIzol 以 $10\text{ cm}^2/\text{ml}$ 为标准。放置 10 min 使细胞充分裂解 然后经氯仿处理 异丙醇沉淀 75% 乙醇溶液洗涤 干燥 加入 20 μl 的 DEPC 水将沉淀溶解 利用紫外分光光度计测量 RNA 的浓度及 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的比值 比值一般在 1.8 ~ 2.0 表示 RNA 的质量好 可以用于下一步的实验。取质量好的 RNA 按照 TaKaRa 逆转录试剂盒的说明配置逆转录反应液 将 RNA 逆转录为 cDNA。测量 cDNA 的浓度 计算 3 组的 cDNA 总量 将要进行 RT-PCR 的 3 组 cDNA 总量保持一致。RT-PCR 按 25 μl 反应体系进行。COX-2 mRNA 上游引物: 5'-TTTCGGGAGCACAA-CAGAGTG-3' 下游引物: 5'-TAACCGCTCAGGTGT-TGCAC-3'; mPGES-1 mRNA 上游引物: 5'-TAGC-CATATTGGAGATGCTGTGG-3' 下游引物: 5'-TCA-GAGCAAAAGTTAGCTGAACTGG-3'; 上游引物: 5'-GCCTCGTTCATAGACAAGATGGT-3' , GAPDH 下游引物: 5'-GAAGGCAGCCCTGGTAACC-3'。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s 共 35 个循环 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶板稳压电泳(120 V/100 Ma 40 min) 经数码凝胶图像定量分析系统及凝胶密度扫描机成像处理系统成像、条带密度扫描。

1.3.3 Western blot 法检测塞来昔布对成骨细胞增殖的影响 将处于对数生长期的人成骨细胞转移到 3 张 6 孔板中 依次将 3 张培养板分为 3 组: 空白对照组、IL-1 刺激组(阴性对照组)、塞来昔布 + IL-1 刺激组(药物干预组) 加药 24 h 后收集细胞 加入适量的细胞裂解液 冰上裂解 30 min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min 提取蛋白。以 BCA 法进行蛋白定量 120 $^{\circ}\text{C}$ 蛋白变性 5 min 每组的蛋白上样量为 20 μg 上样后用 120 V 电泳 45 min 然后用 100 V 转膜 1 h 含 5% 脱脂牛奶 TBST 液封闭 2 h 孵育 COX-2 和 mPGES-1 单抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜 TBST 清洗 3 次 每次 15 min。加入辣根酶标记的鼠或兔二抗孵育 1 h TBST 清洗干净后 于曝光仪中涂上发光剂曝光 并保存图片。

1.3.4 MTT 法检测塞来昔布对成骨细胞增殖的影响 取生长状态良好的人成骨细胞于 6 孔板中 加入浓度为 10 ng/ml 的 IL-1 处理细胞 继续培养 24 h 后 调整细胞密度为 5×10^4 个/ml 接种到 96 孔板

中 每孔加入细胞悬浮液 100 μl 过夜培养。待细胞生长至 80% ~ 90% 细胞密度时 在实验组的每孔中加入不同浓度的 COX-2 抑制剂塞来昔布 分别干预 24、48 h(以上每个组设置 4 个复孔) 同时设置调零孔和不加药物干预的空白对照孔。塞来昔布的浓度分别为(0、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$) 在培养板的每孔加入 20 μl 的 MTT(5 mg/ml) 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光孵育 4 h 后结束培养 小心的吸去上清液 每孔加入 150 μl DMSO 在摇床上低速振荡 15 min 使孔内的结晶充分溶解后 在酶联免疫酶标仪上测定 570 nm 波长处各孔光密度(optical density ,OD) 值 取 4 个复孔的平均值。按照以下公式计算细胞的抑制率: 细胞增殖抑制率(%) = $(1 - \text{OD}_{\text{实验组}} \text{平均值} / \text{OD}_{\text{对照组}} \text{平均值}) \times 100\%$ 。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示 单变量两组之间的比较采用 *t* 检验 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 塞来昔布对成骨细胞中 COX-2 mRNA、mPGES-1 mRNA 表达的影响 所有阴性对照组、阳性对照组、药物干预组的成骨细胞经 TRIzol 裂解提取后进行 RNA 检测。总 RNA 经紫外分光光度计测量 各组 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.8 ~ 2.0 RNA 质量较好 表明无 DNA 和蛋白质污染 $\text{OD}_{230}/\text{OD}_{260}$ 为 1.2 ~ 1.6 表明盐离子清洗干净 残留较少。RT-PCR 检测 3 组细胞的 COX-2、mPGES-1 mRNA 的表达结果显示: IL 刺激人成骨细胞后 细胞内的 COX-2、mPGES-1 mRNA 的表达增加; 塞来昔布作用于 IL-1 刺激组的人成骨细胞使 COX-2、mPGES-1 mRNA 的表达降低 见图 1。

2.2 塞来昔布对成骨细胞中 COX-2、mPGES-1 蛋白表达的影响 同空白对照组相比 阴性对照组成骨细胞中 COX-2、mPGES-1 蛋白表达增加; 同阴性对照组相比 药物干预组 COX-2、mPGES-1 蛋白表达降低($F_1 = 1.54, F_2 = 2.92, P < 0.05$)。见图 2。

2.3 塞来昔布对成骨细胞增殖的影响 实验结果显示塞来昔布对炎症状态下人成骨细胞的增殖具有抑制作用 48 h 的细胞增殖抑制率高于 24 h 的细胞增殖抑制率; 不同浓度的塞来昔布作用于成骨细胞表现为随着塞来昔布浓度的增加 其抑制率呈上升趋势 差异具有统计学意义($F = 22.86, P < 0.05$) 见表 1、图 3。

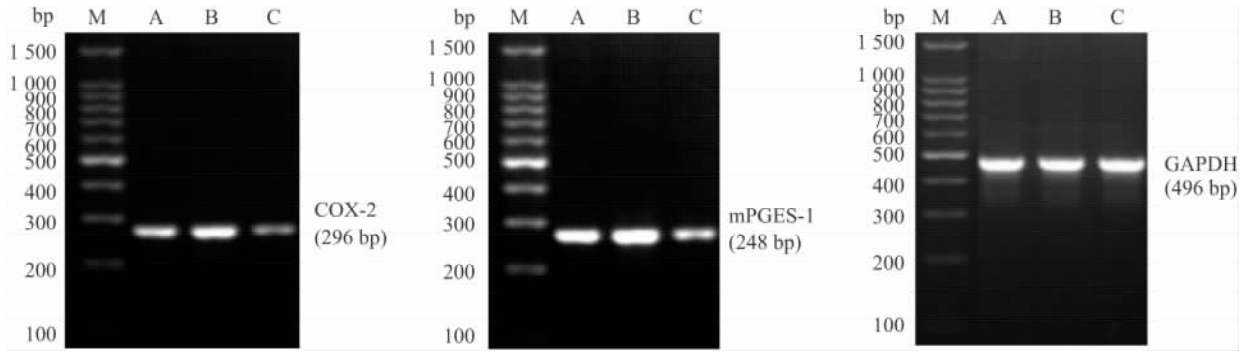


图1 塞来昔布对人成骨细胞 COX-2、mPGES-1 mRNA 表达的影响
M: marker; A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 药物干预组

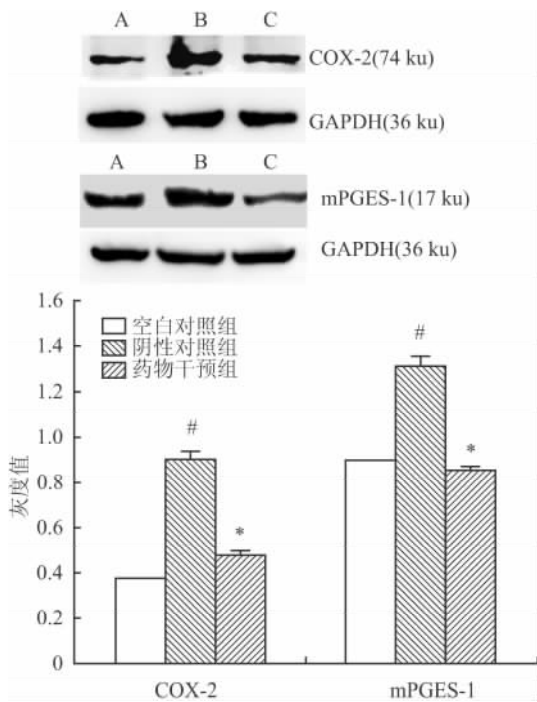


图2 塞来昔布对人成骨细胞 COX-2、mPGES-1 蛋白表达的影响
A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 药物干预组; 与空白对照组比较: # $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: * $P < 0.05$

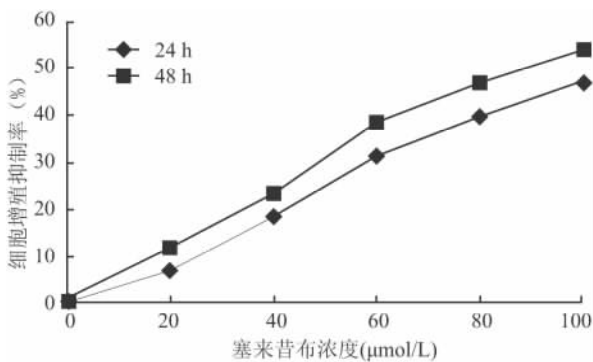


图3 塞来昔布作用于阴性对照组的人成骨细胞在 24 h 和 48 h 其生存率的变化趋势

表1 不同浓度的塞来昔布分别在 24 h 和 48 h 对成骨细胞生长的影响($\bar{x} \pm s$)

塞来昔布浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	24 h		48 h	
	OD ₅₇₀	抑制率(%)	OD ₅₇₀	抑制率(%)
0	1.02 ± 0.26	0	1.16 ± 0.34	0
20	0.95 ± 0.19	6.86 ± 0.84*	1.02 ± 0.26	11.65 ± 2.00
40	0.83 ± 0.13	18.80 ± 1.67*	0.89 ± 0.30	23.44 ± 3.22
60	0.74 ± 0.22	31.25 ± 2.61*	0.71 ± 0.06	38.96 ± 3.75
80	0.62 ± 0.31	39.70 ± 3.50*	0.61 ± 0.73	47.53 ± 2.36
100	0.54 ± 0.17	46.88 ± 2.25*	0.53 ± 0.40	54.20 ± 2.28

与 48 h 比较: * $P < 0.05$

3 讨论

绝大部分组织细胞 COX-2 在正常情况下的表达很低,在炎症、创伤等多种刺激因子作用下可以诱导其高表达^[5-6],并且 mPGES-1 受 COX-2 诱导产生高表达。研究^[7-8]表明 COX-2 和 mPGES-1 是花生四烯酸生成 PGE2 过程的重要催化酶,PGE2 可以让原始的间充质干细胞诱导分化成成骨细胞,促进成骨细胞的生长,并能调节破骨细胞的分化和功能。研究^[9-10]显示异位骨化是一种病理性的骨形成,多由创伤、感染等刺激诱发多见,成骨细胞在炎症状态下的 COX-2 高表达,提示 COX-2 和 mPGES-1 可能对异位骨化的形成发挥重要作用。COX-2 选择性抑制剂能够选择性地抑制 COX-2 的活性和 mPGES-1 表达,从而减少其生成,PGE2 的合成减少进一步使成骨细胞的分化和生成降低。研究^[11]显示,塞来昔布能够逆转 PGE2 引起的糖蛋白降解及抑制糖蛋白合成的作用,保护机体糖蛋白。因此,从多方面多角度抑制 PGE2 的合成,从而抑制成骨细胞的分化和过度增殖,成为临床治疗患者异位骨化的重要途径。本研究显示同空白对照组相比,阴性对照组 COX-2、mPGES-1 mRNA 和蛋白表达增加;同阴性对照组相

比 塞来昔布干预组 COX-2、mPGES-1 mRNA 和蛋白表达下调,表明 IL-1 刺激成骨细胞中的 COX-2、mPGES-1 表达增高,而塞来昔布能够明显抑制 COX-2、mPGES-1 在炎性状态下的成骨细胞的表达,从而能够抑制 PGE2 的合成,达到抑制人成骨细胞的生成和分化作用。同时本实验用 MTT 法观察不同浓度不同时间点的塞来昔布是否能影响 IL-1 刺激的高表达 COX-2、mPGES-1 的人成骨细胞的生长,实验结果显示塞来昔布对高表达 COX-2、mPGES-1 的人成骨细胞的生长具有抑制作用,随着时间的延长,成骨细胞的增殖率越来越低,48 h 的细胞增殖抑制率高于 24 h 的细胞增殖抑制率;而不同浓度的塞来昔布作用于成骨细胞表现为随着塞来昔布浓度的增加,其增殖抑制率呈上升趋势。

综上所述,塞来昔布能够抑制人成骨细胞的生长,可能与其通过抑制 COX-2、mPGE-1 mRNA 和蛋白表达从而抑制成骨细胞的分化和增殖有关,为临床异位骨化的治疗与研究提供依据。

参考文献

- [1] Sha W, Olesch C, Hanaka H, et al. Necrosis in DU145 prostate cancer spheroids induces COX-2/mPGES-1 derived PGE2 to promote tumor growth and to inhibit T cell activation[J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(7): 1578-88.
- [2] Zhang C, Li C, Sui F, et al. Cinnamaldehyde decreases interleukin-1 beta induced PGE2 production by down-regulation of mPGES-1 and COX-2 expression in mouse macrophage RAW264.7 cells[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2012, 37(9): 1274-8.
- [3] Leclerc P, Wähämaa H, Idborg H, et al. IL-1 β /HMGB1 complexes promote the PGE2 biosynthesis pathway in synovial fibroblasts[J]. *Scand J Immunol*, 2013, 77(5): 350-60.
- [4] Parazzoli S, Harmon J S, Vallerie S N, et al. Cyclooxygenase-2, not microsomal prostaglandin synthase-1, is the mechanism for interleukin-1 β induced prostaglandin E2 production and inhibition of insulin secretion in pancreatic islets[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(38): 32246-53.
- [5] Rapuano B E, Boursiquot T E, et al. The effects of COX-1 and COX-2 inhibitors on prostaglandin synthesis and the formation of heterotopic bone in a rat model[J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2008, 128(3): 333-4.
- [6] Millanta F, Asproni P, Cancedda S, et al. Immunohistochemical expression of COX-2, mPGES and EP2 receptor in normal and re-active canine bone and in canine osteosarcoma[J]. *J Comp Pathol*, 2012, 147(2-3): 153-60.
- [7] Roy K R, Reddy G V, Maitreyi L, et al. Celecoxib inhibits MDR1 expression through COX-2-dependent mechanism in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010, 65(5): 903-11.
- [8] Zhang K, Wang L, Zhang S, et al. Celecoxib inhibits the heterotopic ossification in the rat model with Achilles tenotomy[J]. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 2013, 23(2): 145-8.
- [9] Nauth A, Giles E, Potter B K, et al. Heterotopic ossification in orthopaedic trauma[J]. *J Orthop Trauma*, 2012, 26(12): 684-8.
- [10] Tannous O, Stall A C, Griffith C, et al. Heterotopic bone formation about the hip undergoes endochondral ossification: a rabbit model[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2013, 471(5): 1584-92.
- [11] Mastbergen S C, Bijlsma J W, Lafeber F P. Synthesis and release of human cartilage matrix proteoglycans are differently regulated by nitric oxide and prostaglandin-E2[J]. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67(1): 52-8.

Study on the impact of celecoxib on proliferation of human osteoblasts

Gao Jie, Gui Binjie, Hu Kongzu, et al

(Dept of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To study the impact of celecoxib on proliferation of human osteoblasts. **Methods** The human osteoblasts were cultured and divided into three groups, including the negative control, positive control (stimulated by IL-1) and intervention group (celecoxib + IL-1). The detection of mRNA and protein level of COX-2 and mPGES-1 were measured by real time PCR (RT-PCR) and Western blot. MTT assay was performed to determine the impact of celecoxib on proliferation of human osteoblasts which were treated with IL-1. **Results** RT-PCR and Western blot showed that the detection of mRNA and protein level of COX-2 and mPGES-1 of the positive control (stimulated by IL-1) were significantly higher than that of the negative control and intervention group (celecoxib + IL-1). Celecoxib had cytotoxic effect on the growth of osteoblasts, manifests dose dependence as well as increasing cell inhibition over time. **Conclusion** Celecoxib could inhibit proliferation of osteoblasts, and could inhibit the occurrence of heterotopic ossification by regulating the level of mPGES-1 and COX-2 mRNA and protein.

Key words COX-2; celecoxib; osteoblasts; heterotopic ossification