

塞来昔布对大鼠骨髓间充质干细胞增殖、成骨分化的影响

陈 真 徐 伟 袁赤亭 陈海啸

摘 要 **目的** 观察不同浓度的塞来昔布对 rBMCs 的增殖、成骨诱导分化的影响,探讨塞来昔布影响 rBMCs 成骨诱导分化的可能机制。**方法** 采用全骨髓贴壁法获得 rBMCs;使用不同浓度的塞来昔布(0、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)干预培养 rBMCs,检测不同浓度的塞来昔布对 rBMCs 增殖的影响;采用较高浓度的塞来昔布(100 $\mu\text{mol/L}$)诱导 rBMCs 成骨分化,进行 ALP、茜素红染色,应用 real-time PCR 扩增 ALP、OCN。**结果** 细胞增殖抑制实验表明 100 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布对 rBMCs 增殖抑制明显($P < 0.05$);12.5、25 以及 50 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布对 rBMCs 增殖抑制无影响。ALP 染色结果表明,成骨诱导 3 天对照组以及实验组 ALP 染色均为阴性;诱导 7 天对照组 ALP 染色为阳性,而实验组染色为阴性;诱导 14 天对照组 ALP 染色为阳性,实验组染色阴性。茜素红染色结果表明,成骨诱导 3 天、7 天对照组以及实验组染色均为阴性;诱导至 14 天对照组染色阳性,实验组染色呈阴性。荧光定量 PCR 结果表明,成骨诱导 3 天对照组以及实验组 ALP mRNA、OCN mRNA 表达均较低;成骨诱导 7 天对照组 ALP mRNA 表达明显升高,实验组 ALP mRNA 表达升高趋势较弱,对照组 OCN mRNA 表达与第 3 天相比基本无差异,实验组 OCN mRNA 表达下降明显;诱导 14 天对照组 ALP mRNA 表达出现明显下降,实验组 ALP mRNA 表达与第 7 天相比无明显差异,对照组 OCN mRNA 表达进一步升高,实验组 OCN mRNA 表达与第 7 天相比基本无变化。**结论** 本实验发现,高浓度的塞来昔布(100 $\mu\text{mol/L}$)对 rBMCs 增殖具有显著抑制效应。高浓度的塞来昔布(100 $\mu\text{mol/L}$)能够抑制 rBMCs 成骨诱导分化过程。高浓度的塞来昔布(100 $\mu\text{mol/L}$)能够抑制 rBMCs 成骨诱导分化过程中 ALP 以及 OCN mRNA 表达,表明较高浓度塞来昔布抑制 rBMCs 成骨诱导分化的效应可能通过抑制 ALP 以及 OCN 的基因表达实现,提示在应用 NSAIDs 时应注意剂量等问题,尤其是应避免使用高剂量甚至是超高生理剂量进行药物镇痛治疗。

关键词 塞来昔布 大鼠 骨髓间充质干细胞 增殖 成骨分化

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.031

Effect of Celecoxib on the Proliferation, Psteogenic Differentiation of BMCs. Chen Zhen, Xu Wei, Yuan Chiting, et al. Department of Orthopedic Surgery, Taizhou Hospital Affiliated to Wenzhou Medical University, Zhejiang 317000, China

Abstract **Objective** The purpose of this study was to explore the effects of different concentrations of celecoxib on the proliferation and differentiation of rBMCs. **Methods** The cells were separated through whole bone marrow adherence method. The cells were cultured with different concentrations of celecoxib for 24 and 48 hours and then the cell proliferation was determined by MTS. The rBMCs were cultured in the osteogenic solution with or without of celecoxib and then the ALP and alizarin red staining were performed at 3, 7, 14 days respectively. The total RNA were extracted at 3, 7, 14 days respectively and then to amplify the ALP, OCN, and β -actin with Real-time PCR. **Results** The cell proliferation inhibition experiment showed that the proliferation of rBMCs were significantly inhibited by 100 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib. The ALP and Alizarin Red staining results showed that the activity of ALP expression and calcium deposition of rBMCs were significantly inhibited by the higher doses of celecoxib. Further quantitative PCR showed that the mRNA expression of ALP and OCN on rBMCs were significantly inhibited by the higher doses of celecoxib. **Conclusion** The cell proliferation inhibition experiment showed that the inhibitory effect on cells was more obvious in 100 $\mu\text{mol/L}$ of celecoxib and according to wich we showed be cautious of dosage and duration of drug using during fractures analgesic treatment. The ALP and Alizarin Red staining results showed that higher doses of celecoxib may affected the process of osteogenic differentiation on rBMCs. The quantitative PCR showed that the higher doses of celecoxib may affected the process of osteogenic differentiation through inhibiting the mRNA expression of ALP and OCN.

Key words Celecoxib; Rat; BMCs; Proliferation; Osteogenic differentiation

作者单位:317000 温州医科大学附属台州医院

通讯作者:陈海啸,电子信箱:wlchenzhen@126.com

非甾体类抗炎药 (no steroid anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 是一类具有解热、镇痛、抗炎以及抗风湿作用的药物。在临床上广泛用于骨关节损伤及骨性关节炎的抗炎及镇痛治疗。此类药物通过抑制环氧化酶 (cyclooxygenase, COX) 催化活性进而阻断前列腺素 (prostaglandins, PGs) 的形成以发挥抗炎、镇痛的药理效应^[1]。研究发现传统的 NSAIDs 通过抑制 COX-2 而发挥抗炎、镇痛效应,但由于同时抑制了 COX-1 的表达,使得消化道出血等胃肠道不良事件发生率较高,而选择性 COX-2 抑制剂的问世极大地降低了由于使用传统的 NSAIDs 所伴发的胃肠道不良反应。骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 源于骨髓基质,是一种多能干细胞,经特定条件诱导可以分化成包括成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等多种细胞谱系。BMSCs 经诱导分化可由前成骨细胞向成骨细胞转化。成骨细胞增殖过程中促使骨生长因子分泌增多,以利于骨细胞及骨基质的形成和钙盐沉积并最终加快形成新骨的速度。因此, BMSCs 在骨形成过程中起重要作用。尽管 NSAIDs 用于创伤术后镇痛效果显著,由于在临床上使用较为广泛,在使用过程中所暴露的安全用药问题仍然值得人们关注。

过去的几十年间,已有相当数量的实验研究发现传统的 NSAIDs 包括选择性 COX-2 抑制剂可能对骨折愈合存在一定的负面效应,并且相关研究已经表明骨折中使用此类药物将影响骨折愈合^[2-6]。有研究者通过大鼠尺骨应力性骨折造模发现使用传统的 NSAIDs [30mg/(kg·d)] 以及选择性 COX-2 抑制剂 DFU [2.0mg/(kg·d)] 能不同程度地影响造模术后骨折愈合^[7]。类似的,多个临床相关研究指出骨折以及脊柱融合术后使用 NSAIDs 将延迟骨折愈合以及增加脊柱融合的时间^[8]。Bard 等^[9]在观察髌臼骨折术后使用吲哚美辛预防异位骨化的过程中同时评估合并的长骨骨折出现骨折不愈合的可能风险。与对照组相比,吲哚美辛组骨折不愈合率高达 27%, 放疗组骨折不愈合率为 7%。并且已有相关研究阐释 NSAIDs 通过抑制 COX-2 以及前列腺素 (PGs) 的生物合成,进而干扰成骨细胞以及破骨细胞的功能并最终影响骨修复与重建。

由于目前相关的研究报道大多涉及动物骨折模型研究,而关于选择性 COX-2 抑制剂对于骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, rBMSCs) 的增殖及分化效应的研究却鲜有报道。本研究选用骨科临床使用较为广泛的选择性 COX-2 抑

剂-塞来昔布作为实验药物。已知该药物临床常规治疗剂量的药物浓度为 10 μ mol/L,基于该药物浓度,本实验初期分别选用 12.5、25、50、100 以及 200 μ mol/L 塞来昔布连续干预 rBMSCs 3 天,200 μ mol/L 组基本无细胞存活^[10,11]。故本实验选取 12.5、25、50、100 μ mol/L 作为实验药物浓度。本研究目的旨在观察塞来昔布对于体外分离、培养的 rBMSCs 增殖以及成骨分化诱导的直接效应以评估塞来昔布对于 rBMSCs 生物学特性的具体影响。

材料与方法

1. 实验动物:4 周龄雌性 SD 大鼠 (购于浙江省医学科学院)。

2. 主要试剂及仪器:胰蛋白酶、DMEM low glucose liquid medium (Gibco)、胎牛血清、PBS (Hyclone)、CD29、CD45、CD90 (BD)、MTS (Promega)、塞来昔布、 β -甘油磷酸钠、地塞米松、抗坏血酸、茜素红染料 (Sigma 公司)、FS Universal SYBR Green Master (ROX) (瑞士 Roche 公司)、RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (加拿大 Fermentas 公司)、 β -actin 引物、ALP 引物、OCN 引物 (上海捷瑞生物工程有限公司)、Cell cycle staining Kit (杭州联科生物技术有限公司)、碱性磷酸酶染色试剂盒 (上海虹桥乐翔医用试剂有限公司)、倒置相差显微镜 (Leica 公司)、流式细胞仪、CD29、CD90、CD34、CD45 (BD)、RT6000 酶标分析仪 (Rayto)、细胞培养箱 (Forma311)、高速冷冻离心机 (Thermo Scientific 公司)、纯水仪 (Heal Force 公司)、核酸分析仪 (美国 BID-ARD 公司)、7300 real time PCR System (美国 Applied biosystem 公司)、PCR 扩增仪、小型高速离心机 (德国 Eppendorf 公司)、离心机 (湘仪)。

3. 实验方法:首先骨髓取自 4 周龄雌性 SD 大鼠,采用全骨髓贴壁培养法初步获取 rBMSCs,通过传代培养至 p2 代。取 p2 代细胞使用成骨分化诱导培养 21 天后行茜素红染色并使用流式细胞仪检测细胞表面标记 CD34、CD29、CD45、CD90 表达情况对细胞表面抗原进行鉴定。通过细胞计数描绘细胞生长曲线并计算细胞倍增时间。本研究通过设置不同浓度塞来昔布 (100、50、25、12.5 μ mol/L) 干预培养细胞观察药物对 rBMSCs 增殖的影响。根据增殖抑制实验笔者获知较低浓度的塞来昔布 (50、25、12.5 μ mol/L) 对于细胞增殖的抑制效应差异无统计学意义,后续笔者选取 100 μ mol/L 塞来昔布观察药物对 rBMSCs 成骨诱导分化的影响。本研究通过设置实验组:10%

FBS 的 DMEM 低糖培养基 + 1% 的 DMSO + 100 μ mol/L 塞来昔布 + 成骨诱导液 (10⁻⁵ mol/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸、50 μ g/ml 抗坏血酸); 对照组: 10% FBS 的 DMEM 低糖培养基 + 1% 的 DMSO + 成骨诱导液 (10⁻⁵ mol/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸、50 μ g/ml 抗坏血酸), 分别在培养的第 3 天、7 天以及 11 天进行 ALP 以及茜素红染色以观察塞来昔布对 rBMSCs 成骨诱导分化的影响。最后通过荧光定量 PCR 检测成骨相关基因 ALP、OCN 表达变化。

4. 统计学方法: 应用扩增 ALP、Runx2、OCN 以及 β -actin, 采集图像, 应用 Quantity one 软件进行灰度分析。cDNA 扩增结束, 使用 Applied Biosystems 7200 PCR 系统得到各样本的 CT 值, 使用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 统计量以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

成骨分化诱导 21 天诱导组镜下可见明显钙化结节, 染色后可见结节红染明显; 对照组镜下未见明显钙化结节形成, 进一步染色后无明显红染。成骨分化诱导实验表明所培养的 rBMSCs 具有较好的分化成

骨的能力 (图 1)。

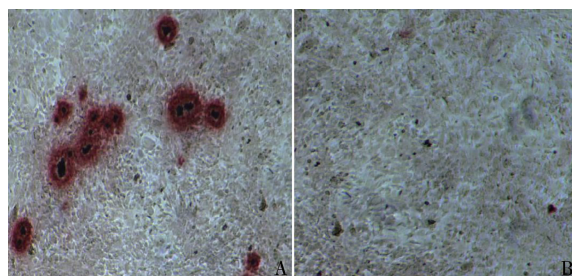


图 1 茜素红染色结果 ($\times 100$)

A. 诱导组茜素红染色结果; 成骨诱导分化 21 天;

B. 对照组茜素红染色结果

细胞表面抗原 CD29、CD90、CD34、CD45 流式检测结果显示, CD34 阳性率 $< 1\%$, CD45 阳性率 $< 1\%$, CD90 阳性率 $> 99\%$, CD29 阳性率 $> 95\%$ (图 2)。根据 rBMSCs 细胞计数结果描绘生长曲线, 计算得细胞倍增时间约为 26h (图 3)。细胞增殖抑制实验结果表明 100 μ mol/L 塞来昔布对 rBMSCs 增殖抑制明显, 具有统计学意义 ($P < 0.05$); 50、25 以及 12.5 μ mol/L 塞来昔布对 rBMSCs 增殖抑制差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 4)。

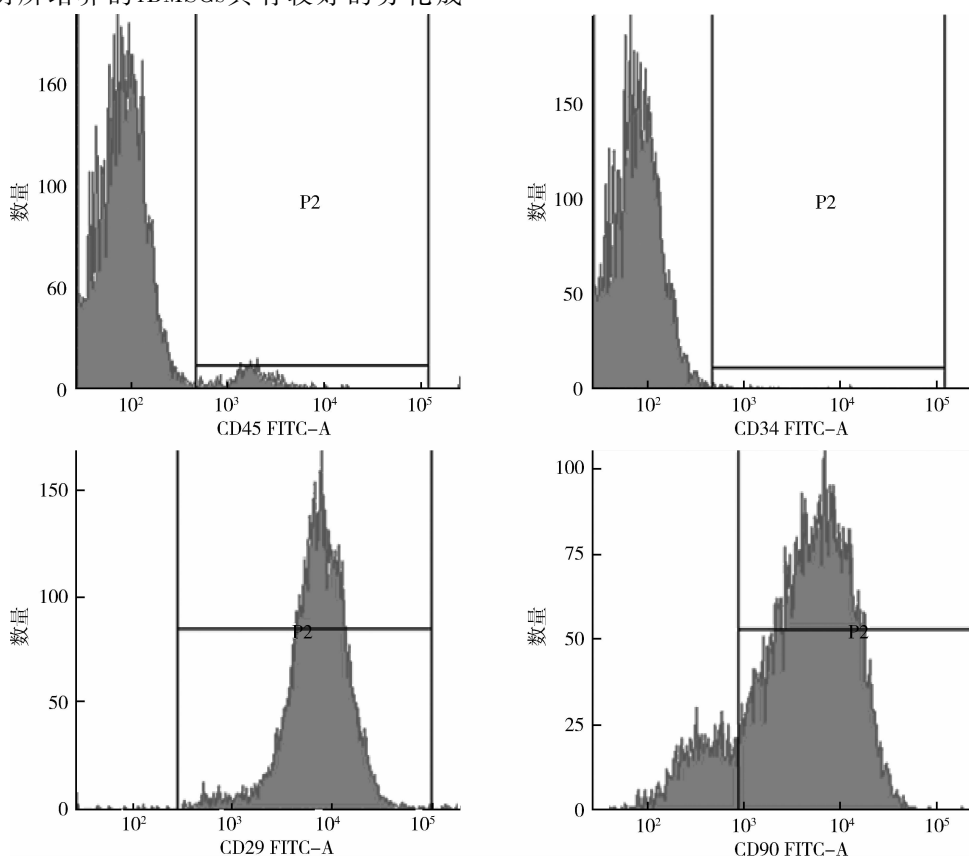


图 2 rBMSCs 流式细胞表面抗原检测结果

A. CD45 阳性率 $< 1\%$; B. CD45 阳性率 $< 1\%$; C. CD29 阳性率 $> 95\%$; D. CD90 阳性率 $> 99\%$

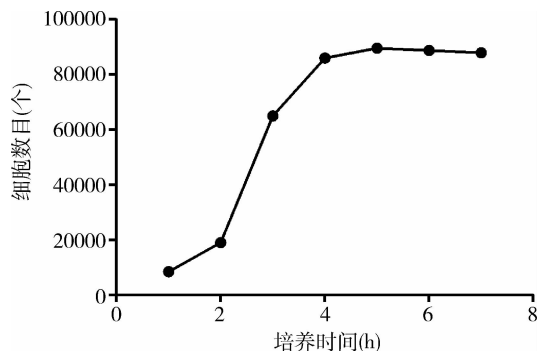


图 3 P3 代 rBMSCs 的生长曲线

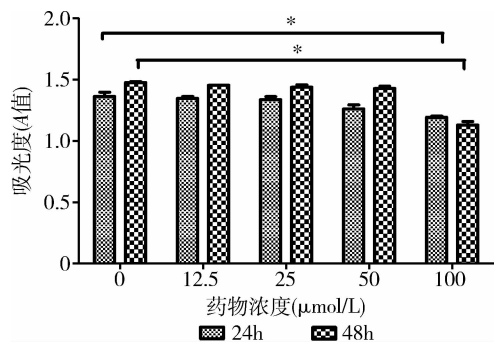


图 4 不同浓度塞来昔布对 rBMSCs 增殖的影响

* $P < 0.05$

成骨诱导第 3 天 ALP 染色结果提示对照组以及实验组 ALP 表达活性均较微弱,染色均为阴性;诱导 7 天对照组 ALP 活性逐渐上升,染色为阳性,而实验组染色始终为阴性;诱导 14 天对照组 ALP 活性进一步升高,染色为阳性,实验组可见细胞大量脱落坏死,

染色阴性(图 5)。成骨诱导 3 天茜素红染色结果显示实验组以及对照组染色均为阴性;诱导 7 天对照组及实验组染色仍为阴性;诱导至 14 天对照组可见明显钙结节形成,染色阳性,而此时实验组细胞以坏死、脱落,未见钙结节形成,染色呈阴性(图 6)。

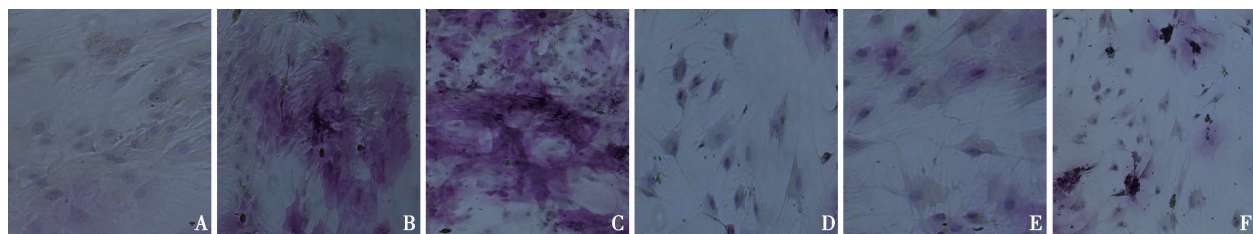


图 5 成骨诱导 3、7、11 天对照组 ALP 染色结果(×100)

A. 培养 3 天 ALP 染色结果;B. 培养 7 天 ALP 染色结果;C. 培养 14 天 ALP 染色结果;
D. 培养 3 天 ALP 染色结果;E. 培养 7 天 ALP 染色结果;F. 培养 14 天 ALP 染色结果

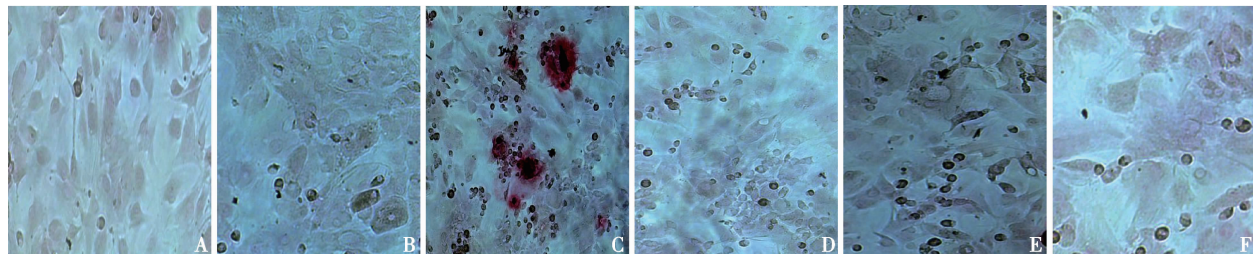


图 6 成骨诱导 3、7、11 天对照组茜素红染色结果(×100)

A. 培养 3 天茜素红染色结果;B. 培养 7 天茜素红染色结果;C. 培养 14 天茜素红染色结果;
D. 培养 3 天茜素红染色结果;E. 培养 7 天茜素红染色结果;F. 培养 14 天茜素红染色结果

实验第 3 天,实验组以及对照组 ALP、OCN mRNA 表达均较低;实验第 7 天,对照组 ALP mRNA 表达与实验第 3 天相比明显升高($P < 0.05$),实验组 ALP mRNA 表达较前升高($P < 0.05$),对照组 OCN mRNA 表达基本维持在较低水平,实验组 OCN mRNA 表达下降明显,并且与实验第 3 天以及实验第 7 天对照组 OCN mRNA 表达水平相比都呈显著下降趋势

($P < 0.05$);实验第 14 天实验组以及对照组 ALP mRNA 表达均出现下降,对照组 OCN mRNA 表达进一步升高达到表达高峰,实验组 OCN mRNA 表达较前仍维持在较低水平(图 7、图 8)。

讨 论

NSAIDs 在临床上广泛用于骨关节损伤及骨性关节炎的抗炎及镇痛治疗。尽管 NSAIDs 对于创伤术

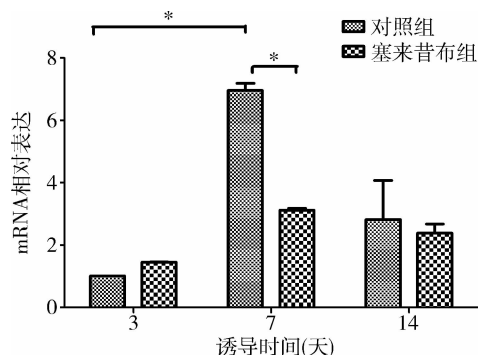


图7 实验组以及对照组成骨诱导过程中3、7、14天碱性磷酸酶 mRNA 相对表达结果

* $P < 0.05$

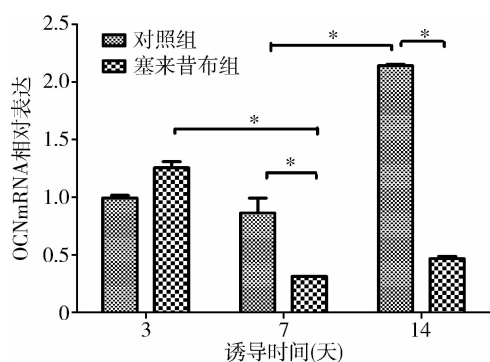


图8 实验组以及对照组成骨诱导过程中3、7、14天 OCN mRNA 相对表达结果

* $P < 0.05$

后镇痛作用显著,但相关研究表明 NSAIDs 能够抑制骨修复并因此影响骨折愈合^[12-14]。已有研究发现 COX-2 以及 PGs 在骨代谢过程中发挥着重要的作用^[15]。通过增加 PGE2 的生物合成能够刺激前成骨细胞增殖,提高 ALP 生物活性并增加胶原合成以促进生物体内的骨形成以及体外的成骨分化作用,而 NSAIDs 能通过抑制 PGE₂ 的合成而抑制成骨分化^[16,17]。目前相关的研究报道大多涉及动物骨折模型研究,而关于选择性 COX-2 抑制剂对于 rBMSCs 的增殖及分化效应的研究却鲜有报道。本实验研究选用骨科临床使用较为广泛的选择性 COX-2 抑制剂——塞来昔布作为实验药物以探索不同浓度的塞来昔布对于 rBMSCs 增殖以及成骨诱导分化过程的具体效应。笔者选择了目前较为常用且细胞获取率较高的全骨髓法以纯化以及扩增 rBMSCs。通过流式细胞表面抗原鉴定获知 CD34、CD45 表达阴性,CD29、CD90 表达阳性,表明分离培养的细胞具有与 BMSCs 一致的细胞表型特征。进一步的定向成骨诱

导分化能力实验结果显示成骨诱导 21 天茜素红染色呈明显阳性。故本课题前期实验提示笔者已经成功分离、培养获得了 rBMSCs。

已知塞来昔布的临床常规治疗剂量的药物浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,基于该药物浓度,本实验初期分别选用 12.5、25、50、100 以及 200 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布连续干预 rBMSCs 3 天,200 $\mu\text{mol/L}$ 组基本无细胞存活^[10,11]。故实验选取 12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 作为实验药物浓度。部分细胞增殖抑制实验发现,与对照组相比,实验组经不同浓度的塞来昔布分别干预 rBMSCs 24h 以及 48h,较低浓度的塞来昔布(50、25、12.5 $\mu\text{mol/L}$)对于细胞增殖的抑制效应差异无统计学意义,表明较低浓度的塞来昔布对于体外培养的 rBMSCs 增殖无影响。然而,当使用远超治疗剂量的塞来昔布(100 $\mu\text{mol/L}$)干预细胞时,细胞增殖抑制明显,细胞形态固缩,细胞活力明显降低,并且增殖抑制效应与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明塞来昔布在达到一定浓度后才能抑制 rBMSCs 的增殖。类似研究也发现 NSAIDs 对于小鼠 BMSCs 增殖具有抑制效应。并且 NSAIDs 能够抑制多种类型细胞的增殖的同时并能影响细胞周期并介导细胞凋亡。Chang 等选取源自大鼠颅盖骨的成骨细胞并使用 NSAIDs 进行药物干预。该研究发现治疗剂量范围内的 NSAIDs 可能通过改变细胞周期 G₀ 以及 G₁ 期以诱导成骨细胞凋亡并最终抑制骨形成修复重建。本实验中使用 100 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布干预 rBMSCs 24h 以及 48h 提示细胞增殖抑制明显,因此在实验后期需开展进一步研究以探索不同浓度塞来昔布对于体外培养的 rBMSCs 细胞周期是否具有效应以进一步明确塞来昔布影响骨修复、重建过程中细胞增殖的具体作用机制。

本研究发现,成骨细胞分化成骨需要经历细胞增殖、细胞外基质成熟和矿化阶段 3 个不同的阶段。而 ALP 活性增强和细胞外基质沉积钙化是成骨分化成熟的两个重要标志。因此,本次实验研究通过 100 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布干预诱导 rBMSCs 成骨分化过程,并以 ALP 表达和钙结节沉积来作为成骨分化观察指标。ALP 作为成骨细胞成熟的标志酶之一被认为是细胞外基质成熟的早期指标,相关的体外细胞实验研究发现 ALP 活性在细胞诱导培养的 14 ~ 20 天达到峰值,随后逐渐下降。本实验研究发现塞来昔布干预诱导 3 天与单纯成骨诱导培养 3 天,实验组以及对照组 ALP 染色均为阴性;诱导 7 天对照组细胞

ALP 活性逐渐增强,实验组 ALP 染色仍为阴性;诱导至 14 天对照组 ALP 染色阳性,灰黑色沉淀较为明显,实验组由于细胞大量脱落坏死,ALP 染色仍为阴性。茜素红染色结果显示成骨诱导 3 天以及 7 天实验组以及对照组茜素红染色均为阴性,均未见明显钙结节形成;培养至 14 天对照组茜素红染色可见明显钙结节形成,实验组细胞坏死明显,染色阴性。本研究通过观察成骨诱导分化不同时段应用高浓度塞来昔布 ($100\mu\text{mol/L}$) 干预 rBMSCs 以观察其对成骨分化的影响,结果显示较高剂量的塞来昔布对于 rBMSCs 成骨分化诱导过程中 ALP 和钙沉积都有显著抑制作用。而 Yoon 等的研究发现炎症因子诱导环境下,塞来昔布能够抑制 hBMSCs 分化成骨,但对于无炎症环境的成骨诱导分化则无影响。本实验研究结果提示高剂量塞来昔布 ($100\mu\text{mol/L}$) 能够显著抑制未经炎症反应因子诱导的 rBMSCs 成骨分化。可能较高浓度塞来昔布抑制了 rBMSCs 成骨分化早期过程中成骨细胞增殖,使得成骨细胞数量明显减少以至无法成熟、矿化形成骨结节。

本研究的局限性在于只选取了单一较高浓度的塞来昔布 ($100\mu\text{mol/L}$) 进行成骨分化诱导实验,而较低浓度的塞来昔布是否影响 rBMSCs 成骨诱导分化过程有待于后期实验设置多个不同浓度梯度以探索塞来昔布对于 rBMSCs 成骨诱导分化的影响是否具有剂量依赖性。同时需要在后期的实验研究中模拟炎症环境以探索炎症环境以及非炎症环境下塞来昔布对于 rBMSCs 成骨诱导分化的影响的作用途径是否相同。研究发现,ALP 作为细胞外基质成熟的早期标志基因在成骨分化的早期表达升高,而在细胞外基质矿化阶段,OCN 表达增加。本实验研究通过探讨高剂量的塞来昔布 ($100\mu\text{mol/L}$) 对 rBMSCs 体外成骨分化诱导的具体作用机制发现在成骨分化诱导的早期 (实验第 3 天) 实验组以及对照组 ALP、OCN mRNA 表达均较低。在分化成骨过度时期 (实验第 7 天) 对照组 ALP mRNA 表达进一步上升达到较高水平,实验组 ALP 表达基本维持同前。与实验组相比,对照组 ALP mRNA 表达显著升高,差异明显。对照组 OCN 表达基本维持在较低水平。实验组 OCN 表达下降明显,并且与实验第 3 天相比呈显著下降趋势;当成骨细胞分化成熟培养细胞进入矿化期 (实验第 14 天) 实验组以及对照组 ALP 表达均出现明显下降,对照组 OCN 表达进一步升高达到表达高峰,实验组 OCN 表达较前仍维持在较低水平。结合荧光定量

PCR 结果,本研究结果提示高浓度的塞来昔布 ($100\mu\text{mol/L}$) 可能是通过抑制 ALP 以及 OCN 等成骨分化相关因子的 mRNA 表达而抑制成骨诱导分化过程。

综上所述,本实验研究通过细胞增殖抑制实验结合成骨诱导过程中 ALP 表达、钙结节形成以及 ALP、OCN mRNA 的定量表达发现高浓度的塞来昔布 ($100\mu\text{mol/L}$) 能够抑制 rBMSCs 增殖以及成骨诱导分化过程,但是否有其他机制参与其中仍有待于后续相关实验进一步研究。因此,当考虑使用高于生理剂量的 NSAIDs 时,对于药物的选择以及用药持续时间仍需谨慎把握以尽量降低药物对于骨折愈合过程中骨细胞增殖以及骨修复重建的不利影响。由于实验药物用药剂量以及给药持续时间等重要的药理学参数尚未明确统一,目前的离体细胞以及在体动物实验研究仍存在一定的局限性,使得相关的细胞以及动物实验研究结果尚难以直接转化应用于临床,因此需开展多中心、大样本、持续时间较长的随机、对照临床试验以指导临床用药。

参考文献

- 1 Mullis BH, Copland ST, Winhold PS, *et al.* Effect of COX-2 inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs on a mouse fracture model [J]. *Injury*, 2006, 37(9):827-837
- 2 Simon AM, O'Connor JP. Dose and time-dependent effects of cyclooxygenase-2 inhibition on fracture-healing [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2007, 89(3):500-511
- 3 Garcia-Martinez O, De Luna-Bertos E, Romos-Torrecillas J, *et al.* Repercussions of NSAIDs drugs on bone tissue: the osteoblast [J]. *Life Sci*, 2015, 123:72-77
- 4 Leonelli SM, Goldberg BA, Safanda J, *et al.* Effects of a cyclooxygenase-2 inhibitor (rofecoxib) on bone healing [J]. *Am J Orthoped*, 2006, 35(2):79-84
- 5 Karachalios T, Boursinos L, Poultides L, *et al.* The effects of the short-term administration of low therapeutic doses of anti-COX-2 agents on the healing of fractures. An experimental study in rabbits [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2007, 89(9):1253-1260
- 6 Endo K, Saiyo K, Komatsubara S, *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibitor delays fracture healing in rats [J]. *Acta Orthopaedica*, 2005, 76(4):470-472
- 7 Reuben SS, Ablett D, Kaye R. High dose nonsteroidal anti-inflammatory drugs compromise spinal fusion [J]. *Canadian J Anesth*, 2005, 52(5):506-512
- 8 Lu C, Xing Z, Wang X, *et al.* Anti-inflammatory treatment increases angiogenesis during early fracture healing [J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2012, 132(8):1205-1213
- 9 Sagi HC, Jordan CJ, *et al.* Indomethacin prophylaxis for heterotopic ossification after acetabular fracture surgery increases the risk for non-

- union of the posterior wall[J]. *J Orthop Trauma*, 2014, 28(7):377 – 383
- 10 Depre M, Ehrlich E, Van Hecken A, *et al.* Pharmacokinetics, COX – 2 specificity, and tolerability of supratherapeutic doses of rofecoxib in humans[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2000, 56(2):167 – 174
 - 11 Pountos I, Georgouli T, Calori GM, *et al.* Do nonsteroidal anti – inflammatory drugs affect bone healing? A critical analysis [J]. *Sci World J*, 2012, 2012:606404
 - 12 McCormack PL. Celecoxib: a review of its use for symptomatic relief in the treatment of osteoarthritis, rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis[J]. *Drugs*, 2011, 71(18):2457 – 2489
 - 13 Williams A. Should non – steroidal anti – inflammatory drugs be given to orthopaedic patients with fractures? [J]. *Br J Hosp Med; Lond*, 2007, 68(8):452
 - 14 Dimmen S, Nordsletten L, Engebretsen L, *et al.* Negative effect of parecoxib on bone mineral during fracture healing in rats[J]. *Acta Ortop*, 2008, 79(3):438 – 444
 - 15 Welting TJ, Caron MM, Emans PJ, *et al.* Inhibition of cyclooxygenase – 2 impacts chondrocyte hypertrophic differentiation during endochondral ossification [J]. *Eur Cell Mater*, 2011, 22:420 – 36; discussion 436 – 437
 - 16 Okada Y, Lorenzo J A, Freeman A M, *et al.* Prostaglandin G/H synthase – 2 is required for maximal formation of osteoclast – like cells in culture[J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(6):823 – 832
 - 17 Weinreb M, Shamir D, Machwate M, *et al.* Prostaglandin E₂ (PGE₂) increases the number of rat bone marrow osteogenic stromal cells (BMSC) via binding the EP4 receptor, activating sphingosine kinase and inhibiting caspase activity[J]. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2006, 75(2):81 – 90
- (收稿日期:2016 – 06 – 15)
(修回日期:2016 – 07 – 24)
-
- (接第 188 页)
- 4 Ou Jh J, Kim SJ, Syed GH, *et al.* Hepatitis C virus induces the mitochondrial translocation of parkin and subsequent mitophagy[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(3): e1003285
 - 5 Meissner C, Lorenz H, Weihofen A, *et al.* The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate pink1 trafficking[J]. *Neurochem*, 2011, 117(5): 856 – 867
 - 6 Deas E, Plun – Favreau H, Gandhi S, *et al.* PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(5): 867 – 879
 - 7 Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome – independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling [J]. *Science*, 2007, 315(5809): 201 – 205
 - 8 Green DR, Narendra DP, Jin SM, *et al.* PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate parkin [J]. *PLoS Biol*, 2010, 8(1): e1000298
 - 9 Sadoshima J, Kubli DA, Cortez MQ, *et al.* PINK1 is dispensable for mitochondrial recruitment of parkin and activation of mitophagy in cardiac myocytes[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0130707
 - 10 Shiba – Fukushima K, Imai Y, Yoshida S, *et al.* PINK1 – mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin – like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy [J]. *Sci Rep*, 2012, 2:1002
 - 11 Shiba – Fukushima K, Arano T, Matsumoto G, *et al.* Phosphorylation of mitochondrial polyubiquitin by PINK1 promotes Parkin mitochondrial tethering[J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(12): e1004861
 - 12 Chen Y, Dorn GW. PINK1 – phosphorylated mitofusin 2 is a parkin receptor for culling damaged mitochondria[J]. *Science*, 2013, 340(6131): 471 – 475
 - 13 Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, *et al.* Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(7): 4078 – 4083
 - 14 Ashrafi G, Schlehe JS, LaVoie MJ, *et al.* Mitophagy of damaged mitochondria occurs locally in distal neuronal axons and requires PINK1 and Parkin[J]. *J Cell Biol*, 2014, 206(5): 655 – 670
 - 15 Ding WX, Ni HM, Li M, *et al.* Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species – mediated autophagy induction and Parkin – ubiquitin – p62 – mediated mitochondrial priming[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(36): 27879 – 27890
 - 16 Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, *et al.* PINK1/Parkin – mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(2): 119 – 131
 - 17 Narendra D, Kane LA, Hauser DN, *et al.* p62/SQSTM1 is required for Parkin – induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both[J]. *Autophagy*, 2014, 6(8): 1090 – 1106
 - 18 Michiorri S, Gelmetti V, Giarda E, *et al.* The Parkinson – associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(6): 962 – 974
 - 19 Van Humbeeck C, Cornelissen T, Hofkens H, *et al.* Parkin interacts with Ambra1 to induce mitophagy[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(28): 10249 – 10261
 - 20 Strappazzon F, Nazio F, Corrado M, *et al.* AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of Parkin and p62/SQSTM1 [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(3): 419 – 432
 - 21 Orvedahl A, Sumpter RJr., Xiao G, *et al.* Image – based genome – wide siRNA screen identifies selective autophagy factors[J]. *Nature*, 2011, 480(7375): 113 – 117
 - 22 Ding WX, Yin XM. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis[J]. *Biol Chem*, 2012, 393(7): 547 – 564
 - 23 Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, *et al.* The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(5): 1638 – 1643
 - 24 Dagda RK, Cherra SJ 3rd, Kulich SM, *et al.* Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(20): 13843 – 13855
- (收稿日期:2016 – 04 – 27)
(修回日期:2016 – 05 – 04)