

· 基础研究 ·

抑制环氧合酶-2 表达对软骨细胞发育成熟的影响

王灿, 司文腾

(郑州市骨科医院, 河南 郑州 450052)

摘要 目的:探讨抑制环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)表达对软骨细胞发育成熟的影响及其作用机制。方法:①分析温度对 SV40 病毒大 T 抗原介导永生化小鼠软骨细胞(mouse chondrocytes immortalized by SV40 large T antigen, MCT)发育成熟的影响。将 MCT 在温度 32 ℃、CO₂ 浓度 8% 的细胞培养箱内进行培养,待 MCT 汇合率至 80% 时,分别置于 32 ℃ 下(32 ℃ 培养组)和 37 ℃ 下(37 ℃ 培养组)继续培养。培养 72 h 后,采用相差倒置显微镜观察细胞形态学变化;采用 CIAS 大恒细胞图像分析系统测量细胞长径、短径,并计算细胞体积;提取各复孔中 MCT 的 RNA,逆转录后采用实时定量 PCR 检测 MCT 中 COX-2、胶原蛋白 α-1(X)[Collagen alpha-1(X) chain, COL10A1] 的 mRNA 表达水平;提取各复孔中 MCT 的总蛋白,采用蛋白质印迹法检测 MCT 中 COX-2、COL10A1 的蛋白表达水平。②筛选 COX-2 抑制剂 NS-398 的最佳抑制浓度。将 MCT 在温度 32 ℃、CO₂ 浓度 8% 的细胞培养箱内进行培养,待 MCT 汇合率至 80% 时,按照 NS-398 终浓度为 0.2 μmol · L⁻¹、1 μmol · L⁻¹、2 μmol · L⁻¹、10 μmol · L⁻¹、20 μmol · L⁻¹、25 μmol · L⁻¹、30 μmol · L⁻¹、40 μmol · L⁻¹、50 μmol · L⁻¹、60 μmol · L⁻¹ 将 MCT 分为 10 个干预组,分别加入等体积不同浓度的 NS-398,空白对照组加入等体积的二甲亚砷。于 37 ℃ 下培养 24 h 后,提取各复孔中 MCT 的 RNA,逆转录后采用实时定量 PCR 检测 MCT 中 COX-2 的 mRNA 表达量,比较和筛选 NS-398 对 COX-2 表达的最佳抑制浓度。③分析 NS-398 最佳抑制浓度对 MCT 发育成熟的影响。以②中 NS-398 最低浓度为对照,分析 NS-398 最佳抑制浓度对 MCT 发育成熟的影响。将 MCT 在温度 32 ℃、CO₂ 浓度 8% 的细胞培养箱内进行培养,待 MCT 汇合率至 80% 时,按照 NS-398 终浓度为 0.2 μmol · L⁻¹、40 μmol · L⁻¹ 将 MCT 分为 0.2 μmol · L⁻¹ NS-398 干预组和 40 μmol · L⁻¹ NS-398 干预组,分别加入等体积不同浓度的 NS-398,移至温度 37 ℃、CO₂ 浓度 8% 的细胞培养箱内继续培养。培养 72 h 后,采用①中方法测量细胞体积,检测 MCT 中 COX-2、COL10A1 的 mRNA 和蛋白表达水平。采用 Person 相关分析法分析 COX-2 mRNA 表达量、COL10A1 mRNA 表达量与 MCT 细胞体积的相关性。**结果:**①温度对 MCT 发育成熟的影响。32 ℃ 培养组 MCT 表现为持续增殖状态,37 ℃ 培养组 MCT 表现为肥大状态。37 ℃ 培养组 MCT 细胞体积大于 32 ℃ 培养组[(2 336.19 ± 24.69) μm³, (1 195.27 ± 13.28) μm³, $t = 70.488, P = 0.000$], COX-2、COL10A1 的 mRNA 和蛋白表达量均高于 32 ℃ 培养组(COX-2: 2.09 ± 0.26, 1.33 ± 0.35, $t = 3.019, P = 0.039$; 2.37 ± 0.26, 1.58 ± 0.19, $t = 4.249, P = 0.013$; COL10A1: 2.32 ± 0.34, 1.41 ± 0.21, $t = 3.944, P = 0.017$; 2.56 ± 0.28, 1.59 ± 0.17, $t = 5.129, P = 0.007$)。②COX-2 抑制剂 NS-398 的最佳抑制浓度。37 ℃ 下培养 24 h 后,11 组 MCT 中 COX-2 的 mRNA 表达量比较,差异有统计学意义(1.00 ± 0.11, 0.89 ± 0.09, 0.81 ± 0.08, 1.24 ± 0.13, 0.63 ± 0.06, 0.69 ± 0.07, 0.71 ± 0.07, 0.70 ± 0.06, 0.43 ± 0.04, 0.85 ± 0.09, 0.84 ± 0.08, $F = 38.074, P = 0.000$)。40 μmol · L⁻¹ NS-398 干预组 MCT 中 COX-2 的 mRNA 表达量低于对照组和其他浓度 NS-398 干预组($P = 0.001, P = 0.001, P = 0.001, P = 0.001, P = 0.002, P = 0.001, P = 0.001, P = 0.001, P = 0.001, P = 0.001$)。③NS-398 最佳抑制浓度对 MCT 发育成熟影响的分析结果。培养 72 h 后,40 μmol · L⁻¹ NS-398 干预组 MCT 细胞体积小于 0.2 μmol · L⁻¹ NS-398 干预组[(995.64 ± 10.98) μm³, (2 011.07 ± 20.52) μm³, $t = 70.488, P = 0.000$], COX-2、COL10A1 的 mRNA 和蛋白表达量均低于 0.2 μmol · L⁻¹ NS-398 干预组(COX-2: 0.39 ± 0.04, 0.99 ± 0.09, $t = 15.988, P = 0.000$; 1.53 ± 0.16, 3.97 ± 0.40, $t = 9.810, P = 0.000$; COL10A1: 0.49 ± 0.05, 1.01 ± 0.11, $t = 11.258, P = 0.000$; 1.09 ± 0.12, 2.74 ± 0.29, $t = 9.106, P = 0.001$)。Pearson 相关分析结果表明,COX-2 mRNA 表达量与 COL10A1 mRNA 表达量、COX-2 mRNA 表达量与 MCT 细胞体积、COL10A1 mRNA 表达量与 MCT 细胞体积均呈正相关($r = 0.552, P = 0.011; r = 0.658, P = 0.001; r = 0.590, P = 0.003$)。**结论:**抑制 COX-2 表达能够抑制软骨细胞发育成熟,其作用机制与 COL10A1 表达下调有关。

关键词 内生软骨瘤病;软骨细胞;环氧合酶 2;环氧合酶 2 抑制剂

Effect of inhibition of cyclooxygenase-2 expression on chondrocyte growth and maturation

WANG Can, SI Wenteng

Zhengzhou Orthopedics Hospital, Zhengzhou 450052, Henan, China

基金项目:河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20191147)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression on the growth and maturation of chondrocytes and its mechanism of action. **Methods:** ① To analyze the effect of temperature on the growth and maturation of mouse chondrocytes immortalized by SV40 large T antigen (MCTs). MCTs were cultured in a cell incubator at 32 °C with 8% CO₂. When cell confluence reached 80%, cells were divided into two groups and cultured at 32 °C (32 °C culture group) and 37 °C (37 °C culture group), respectively. After 72 h of culture, the morphological changes of the cells were observed by an inverted phase-contrast microscope. The cell image analysis system (CIAS) was used to measure the long diameter and short diameter of cells and calculate the cell volume. The RNAs of MCTs were extracted from duplicated wells, and mRNA expression levels of COX-2 and collagen alpha-1(X) chain (COL10A1) in MCTs were detected by real-time quantitative PCR after reverse transcription. The total proteins of MCTs were extracted from duplicated wells, and the protein expression levels of COX-2 and COL10A1 in MCTs were detected by Western blot. ② To screen the optimal inhibitory concentration of COX-2 inhibitor NS-398. MCTs were cultured in a cell incubator at 32 °C with 8% CO₂. When cell confluence reached 80%, MCTs were divided into 10 groups, added with the same volume of NS-398 with final concentration of 0.2, 1, 2, 10, 20, 25, 30, 40, 50, and 60 μmol/L. An equal volume of dimethyl sulfoxide was added to the blank control group. After culture at 37 °C for 24 h, the RNAs of MCTs were extracted from duplicated wells. The COX-2 mRNA expression in MCTs was detected by real-time quantitative PCR after reverse transcription, and the optimal inhibitory concentration of NS-398 on COX-2 expression was compared and screened out. ③ To analyze the effect of the optimal inhibitory concentration of NS-398 on the growth and maturation of MCTs. The effect of the optimal inhibitory concentration of NS-398 on the growth and maturation of MCTs was analyzed with the lowest concentration of NS-398 in ② as the control. MCTs were cultured in a cell incubator at 32 °C with 8% CO₂. When cell confluence reached 80%, MCTs were divided into 0.2 μmol/L NS-398 intervention group and 40 μmol/L NS-398 intervention group with the same volume of NS-398 at corresponding concentrations added. Subsequently, MCTs continued to culture in an incubator at 37 °C with 8% CO₂. After culture for 72 h, cell volume was measured by the method as described in ①, and mRNA and protein expression levels of COX-2 and COL10A1 in MCTs were detected. The correlation between mRNA expression levels of COX-2 and COL10A1 and MCT volume was analyzed by Person correlation analysis. **Results:** ① Effect of temperature on the growth and maturation of MCTs. The MCTs in the 32 °C culture group showed sustained proliferation, while those in the 37 °C culture group showed hypertrophy. The volume of MCTs in the 37 °C culture group was larger than that in the 32 °C culture group ($2\,336.19 \pm 24.69$ vs $1\,195.27 \pm 13.28$ μm³), $t = 70.488$, $P = 0.000$, and the mRNA and protein expression of COX-2 and COL10A1 was higher than that in the 32 °C culture group (COX-2: 2.09 ± 0.26 vs 1.33 ± 0.35 , $t = 3.019$, $P = 0.039$; 2.37 ± 0.26 vs 1.58 ± 0.19 , $t = 4.249$, $P = 0.013$; COL10A1: 2.32 ± 0.34 vs 1.41 ± 0.21 , $t = 3.944$, $P = 0.017$; 2.56 ± 0.28 vs 1.59 ± 0.17 , $t = 5.129$, $P = 0.007$). ② Optimal inhibitory concentration of COX-2 inhibitor NS-398. After culture at 37 °C for 24 h, there were significant differences in the mRNA expression of COX-2 between the 11 MCT groups (1.00 ± 0.11 , 0.89 ± 0.09 , 0.81 ± 0.08 , 1.24 ± 0.13 , 0.63 ± 0.06 , 0.69 ± 0.07 , 0.71 ± 0.07 , 0.70 ± 0.06 , 0.43 ± 0.04 , 0.85 ± 0.09 , 0.84 ± 0.08 , $F = 38.074$, $P = 0.000$). The mRNA expression of COX-2 in MCTs of the 40 μmol/L NS-398 intervention group was lower than that of the blank control group and other NS-398 intervention groups ($P = 0.001$, $P = 0.001$, $P = 0.001$, $P = 0.001$, $P = 0.002$, $P = 0.001$, $P = 0.001$, $P = 0.001$, $P = 0.001$, $P = 0.001$). ③ Effect of the optimal inhibitory concentration of NS-398 on MCT growth and maturation. After 72 h of culture, the MCT volume in the 40 μmol/L NS-398 intervention group was smaller than that in the 0.2 μmol/L NS-398 intervention group (995.64 ± 10.98 vs $2\,011.07 \pm 20.52$ μm³), $t = 70.488$, $P = 0.000$, and the mRNA and protein expression of COX-2 and COL10A1 was lower than that in the 0.2 μmol/L NS-398 intervention group (COX-2: 0.39 ± 0.04 vs 0.99 ± 0.09 , $t = 15.988$, $P = 0.000$; 1.53 ± 0.16 vs 3.97 ± 0.40 , $t = 9.810$, $P = 0.000$; COL10A1: 0.49 ± 0.05 vs 1.01 ± 0.11 , $t = 11.258$, $P = 0.000$; 1.09 ± 0.12 vs 2.74 ± 0.29 , $t = 9.106$, $P = 0.001$). The results of Pearson correlation analysis showed that COX-2 mRNA expression was positively correlated with COL10A1 mRNA expression and MCT volume, and COL10A1 mRNA expression was positively correlated with MCT volume ($r = 0.552$, $P = 0.011$; $r = 0.658$, $P = 0.001$; $r = 0.590$, $P = 0.003$). **Conclusion:** The inhibition of COX-2 expression can inhibit the growth and maturation of chondrocytes, and the underlying mechanism is attributed to the down-regulation of COL10A1 expression.

Keywords enchondromatosis; chondrocytes; cyclooxygenase 2; cyclooxygenase 2 inhibitors

内生软骨瘤病是正常软骨内成骨障碍导致的一种发育异常,以长骨干骺端圆形或柱状软骨性肿块为主要病理特征。该病较为罕见,多发生于儿童和青少

年。目前,内生软骨瘤病的病因尚未明确,可能与胚胎期遗留的骨骼内成软骨细胞未正常发育成熟有关^[1]。内生软骨瘤病尚无特效治疗方法,新型靶向治

疗药物的研发成为研究的主要方向^[2-3]。环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)是一种诱导酶,与前列腺素的合成关系密切,在炎症反应和肿瘤发生发展中扮演着重要的角色^[4-6]。有研究发现,COX-2在膜内成骨以及软骨内成骨过程中发挥重要作用^[7-9]。为了进一步探讨 COX-2 与软骨细胞发育成熟的相关机制,我们开展了此项研究,现报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验材料 SV40 病毒大 T 抗原介导永生化小鼠软骨细胞(mouse chondrocytes immortalized by SV40 large T antigen, MCT)由北京中源合聚生物科技公司提供。

1.2 实验试剂 DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP)法免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),免疫荧光染色试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司),TRIzol 试剂(美国 Life Technologies 公司),外源性人端粒酶逆转录酶、实时定量 PCR SYBR PRemix EX Taq 试剂盒、羊抗兔 COX-2 一抗(上海生工生物工程技术有限公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),山羊抗鼠胶原蛋白 $\alpha-1(X)$ [Collagen $\alpha-1(X)$ chain, COL10A1]一抗、辣根过氧化物酶标记免疫球蛋白 G 二抗(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司),COX-2 抑制剂 NS-398(美国 APEX BIO 公司)。

1.3 实验仪器 细胞培养箱(美国赛默飞公司),超净工作台(上海三发科学仪器有限公司),荧光半定量 PCR 仪、蛋白电泳系统(美国 BIO-RAD 公司),凝胶成像系统(美国 GENE 公司)。

2 方法

2.1 实验方法

2.1.1 分析温度对 MCT 发育成熟的影响 分别于 2 块 6 孔板中加入等量的含 8% 胎牛血清的 DMEM 培养基,取等量的 MCT 接种于培养基中,放置于温度 32 ℃、CO₂ 浓度 8% 的细胞培养箱内进行培养。待 MCT 汇合率至 80% 时,将 1 块 6 孔板继续在温度 32 ℃、CO₂ 浓度 8% 的细胞培养箱内进行培养(32 ℃ 培养组),将另 1 块 6 孔板放置于温度 37 ℃、CO₂ 浓度 8% 的细胞培养箱内进行培养(37 ℃ 培养组);每隔 1 d 更换 1 次培养基。培养 72 h 后,吸去培养基,用

PBS 清洗 3 次,加入胰蛋白酶消化后收集 MCT;采用 SP 法进行染色后,于倒置显微镜下观察细胞形态,并采用 CIAS 大恒细胞图像分析系统测量细胞长径、短径,计算细胞体积^[10];每个复孔随机选取 4 个视野,每个视野下随机测定 20 个细胞的数据。分别提取各复孔中 MCT 的 RNA,逆转录后采用实时定量 PCR 检测 MCT 中 COX-2、COL10A1 的 mRNA 表达水平;提取各复孔中 MCT 的总蛋白,采用蛋白质印迹法检测 MCT 中 COX-2、COL10A1 的蛋白表达水平。

2.1.2 筛选 NS-398 的最佳抑制浓度 取一定量的 MCT 接种与 6 孔板内,于温度 32 ℃、CO₂ 浓度 8% 的细胞培养箱内进行培养,待细胞汇合率至 80% 时,按照 NS-398 终浓度为 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 将 MCT 分为 10 个干预组,分别加入等体积不同浓度的 NS-398,空白对照组加入等体积的二甲亚砷。空白对照及每个浓度梯度各做 1 块 6 孔板(6 个复孔)。将 6 孔板置于温度 37 ℃、CO₂ 浓度 8% 的细胞培养箱内进行培养。培养 24 h 后,提取各复孔中 MCT 的 RNA,逆转录后采用实时定量 PCR 检测 MCT 中 COX-2 的 mRNA 表达量,比较和筛选 NS-398 抑制 MCT 中 COX-2 表达的最佳浓度。

2.1.3 分析 NS-398 最佳抑制浓度对 MCT 发育成熟的影响 以 2.1.2 中 NS-398 最低浓度为对照,分析 NS-398 最佳抑制浓度对 MCT 发育成熟的影响。取一定量的 MCT 接种于 6 孔板内,于温度 32 ℃、CO₂ 浓度 8% 的细胞培养箱内进行培养,待细胞汇合率至 80% 时,按照 NS-398 终浓度为 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 将 MCT 分为 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NS-398 干预组和 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NS-398 干预组,分别加入等体积不同浓度的 NS-398,每组各做 1 块 6 孔板(6 个复孔)。将 6 孔板置于温度 37 ℃、CO₂ 浓度 8% 的细胞培养箱内进行培养。培养 72 h 后,采用 2.1.1 中方法测定 MCT 的细胞体积,检测 MCT 中 COX-2、COL10A1 的 mRNA 和蛋白表达水平。

2.2 数据统计方法 采用 SPSS20.0 统计软件对所得数据进行统计学分析。2 种不同温度培养组 MCT 细胞体积及 COX-2、COL10A1 的 mRNA 和蛋白表达量的组间比较均采用 *t* 检验;11 种 NS-398 浓度组 MCT 中 COX-2 的 mRNA 表达量的比较采用单因素

方差分析,组间两两比较均采用 LSD- t 检验;COX-2 mRNA 表达量、COL10A1 mRNA 表达量与 MCT 细胞体积的相关性分析采用 Person 相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 温度对 MCT 发育成熟影响的分析结果 32 ℃ 培养组 MCT 表现为持续增殖状态,37 ℃ 培养组 MCT 表现肥大状态(图 1)。37 ℃ 培养组 MCT 细胞体积大于 32 ℃ 培养组[(2 336.19 ± 24.69) μm^3 , (1 195.27 ± 13.28) μm^3 , $t=70.488$, $P=0.000$], COX-2、COL10A1 的 mRNA 和蛋白表达量均高于 32 ℃ 培养组(表 1)。

3.2 NS-398 最佳抑制浓度的筛选结果 37 ℃ 下培养 24 h 后,11 组 MCT 中 COX-2 的 mRNA 表达量比较,差异有统计学意义($F=38.074$, $P=0.000$)。40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ -398 干预组 MCT 中 COX-2 的 mRNA 表达量低于对照组和其他浓度 NS-398 干预组($P=0.001$, $P=0.001$, $P=0.001$, $P=0.001$, $P=0.002$, $P=0.001$, $P=0.001$, $P=0.001$, $P=0.001$)。见表 2。

3.3 NS-398 最佳抑制浓度对 MCT 发育成熟影响的分析结果 培养 72 h 后,40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NS-398 干预组 MCT 细胞体积大于 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NS-398 干预

组[(995.64 ± 10.98) μm^3 , (2 011.07 ± 20.52) μm^3 , $t=70.488$, $P=0.000$], COX-2、COL10A1 的 mRNA 和蛋白表达量均低于 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NS-398 干预组(表 3)。Pearson 相关分析结果表明,COX-2 mRNA 表达量与 COL10A1 mRNA 表达量、COX-2 mRNA 表达量与 MCT 细胞体积、COL10A1 mRNA 表达量与 MCT 细胞体积均呈正相关($r=0.552$, $P=0.011$; $r=0.658$, $P=0.001$; $r=0.590$, $P=0.003$)。

4 讨论

COX-2 是前列腺素合成过程中的一个重要限速酶,介导炎症因子、血管内皮生长因子的生成与释放,与关节炎性病变相关^[11]。徐永明等^[12]研究发现,COX-2 在力学诱导的大鼠终板软骨细胞退变模型中高表达。Sun 等^[13]研究发现,COX-2 基因缺失型小鼠在骨折愈合过程中表现出明显的修复障碍,认为 COX-2 与骨折愈合存在显著的相关性。骨折愈合过程涉及的膜内成骨与软骨内成骨在机制上类似^[14]。随着 COX-2 抑制剂被发现,探究 COX-2 与骨关节疾病的关系成为研究的热点^[15]。张先启^[16]研究发现,抑制 COX-2 的表达能够通过调控相关细胞因子的表达抑制软骨细胞发育成熟。Li 等^[17]研究也发现,抑制 COX-2 的活性能够有效降低骨折愈合过程

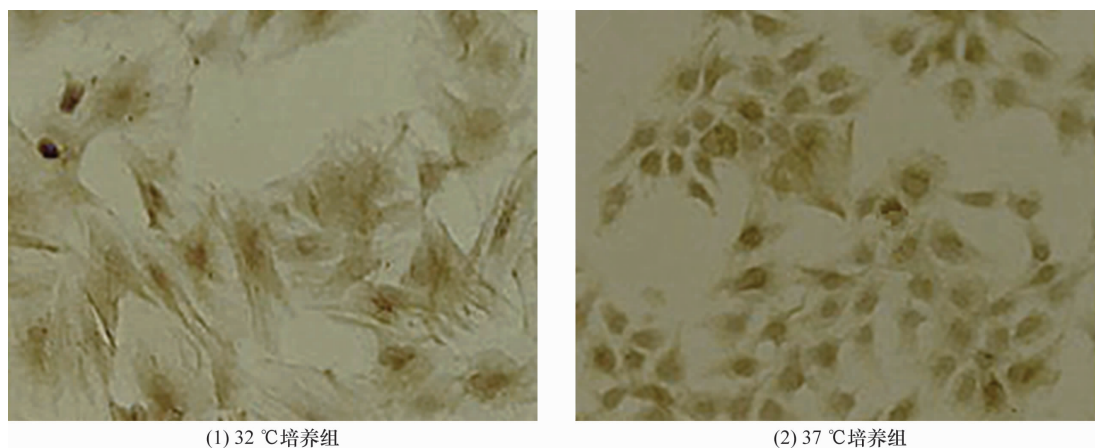


图 1 培养 72 h 后 2 组 SV40 病毒大 T 抗原介导永生小鼠软骨细胞免疫组化染色图片($\times 100$)

表 1 培养 72 h 后 2 组 SV40 病毒大 T 抗原介导永生小鼠软骨细胞环氧合酶-2、胶原蛋白 $\alpha-1(\text{X})$ mRNA 和蛋白的表达结果

组别	样本量/ 孔	环氧合酶-2($\bar{x} \pm s$)		胶原蛋白 $\alpha-1(\text{X})$ ($\bar{x} \pm s$)	
		mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
37 ℃ 培养组	6	2.09 ± 0.26	2.37 ± 0.26	2.32 ± 0.34	2.56 ± 0.28
32 ℃ 培养组	6	1.33 ± 0.35	1.58 ± 0.19	1.41 ± 0.21	1.59 ± 0.17
t 值		3.019	4.249	3.944	5.129
P 值		0.039	0.013	0.017	0.007

表 2 37 ℃ 下培养 24 h 后 11 组 SV40 病毒大 T 抗原介导永生化小鼠软骨细胞环氧合酶 - 2 mRNA 表达结果

组别	样本量/孔	环氧合酶 - 2 mRNA ($\bar{x} \pm s$)
空白对照组	6	1.00 ± 0.11
0.2 μmol · L ⁻¹ NS - 398 干预组	6	0.89 ± 0.09
1.0 μmol · L ⁻¹ NS - 398 干预组	6	0.81 ± 0.08
2.0 μmol · L ⁻¹ NS - 398 干预组	6	1.24 ± 0.13
10 μmol · L ⁻¹ NS - 398 干预组	6	0.63 ± 0.06
20 μmol · L ⁻¹ NS - 398 干预组	6	0.69 ± 0.07
25 μmol · L ⁻¹ NS - 398 干预组	6	0.71 ± 0.07
30 μmol · L ⁻¹ NS - 398 干预组	6	0.70 ± 0.06
40 μmol · L ⁻¹ NS - 398 干预组	6	0.43 ± 0.04
50 μmol · L ⁻¹ NS - 398 干预组	6	0.85 ± 0.09
60 μmol · L ⁻¹ NS - 398 干预组	6	0.84 ± 0.08

表 3 NS - 398 干预下培养 72 h 后 2 组 SV40 病毒大 T 抗原介导永生化小鼠软骨细胞环氧合酶 - 2、胶原蛋白 α - 1 (X) mRNA 和蛋白的表达结果

组别	样本量/孔	环氧合酶 - 2 ($\bar{x} \pm s$)		胶原蛋白 α - 1 (X) ($\bar{x} \pm s$)	
		mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
40 μmol · L ⁻¹ NS - 398 干预组	6	0.39 ± 0.04	1.53 ± 0.16	0.49 ± 0.05	1.09 ± 0.12
0.2 μmol · L ⁻¹ NS - 398 干预组	6	0.99 ± 0.09	3.97 ± 0.40	1.01 ± 0.11	2.74 ± 0.29
<i>t</i> 值		15.988	9.810	11.258	9.106
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.001

中软骨内成骨的速度。然而,目前对于 COX - 2 与软骨细胞发成熟的机制尚未完全明确。

COL10A1 在肥大型软骨细胞中特异性高表达, COL10A1 表达与软骨细胞发育成熟关系密切^[18-19]。李娜^[20]研究发现, COL10A1 表达上调与体外软骨内成骨细胞模型中软骨细胞肥大相关。多项研究^[21-23]发现, COL10A1 是正常软骨内成骨过程中肥大型软骨细胞的重要标志基因, 而 COX - 2 是 COL10A1 基因的候选调控转录因子。本研究显示, MCT 在 32 ℃ 下培养表现为增殖状态, 在 37 ℃ 下培养表现为肥大状态, 37 ℃ 培养组 MCT 中 COX - 2、COL10A1 的 mRNA 和蛋白表达量均高于 32 ℃ 培养组, 提示肥大状态下的 MCT 中 COX - 2 和 COL10A1 的表达均升高。相关性分析结果显示, COX - 2 mRNA 表达、COL10A1 mRNA 表达及细胞体积之间均呈正相关; 提示 COX - 2 和 COL10A1 均参与了 MCT 的发育成熟。我们通过设计 NS - 398 药物浓度梯度实验, 发现 NS - 398 终浓度为 40 μmol · L⁻¹ 时, MCT 中 COX - 2 的 mRNA 表达量最低, 提示该浓度下 NS - 398 对 COX - 2 的抑制作用最强。我们进一步研究发现, 在 37 ℃ 下, NS - 398 最佳抑制浓度能够显著抑制 MCT 中 COX - 2 的 mRNA 和蛋白的表达, 进而下调 COL10A1 的 mRNA 和蛋白表达, 且能同时抑制细胞的发育成熟。

本研究结果表明, 抑制 COX - 2 表达能够抑制软骨细胞发育成熟, 其作用机制与 COL10A1 表达下调有关。但本研究仅探究了 COX - 2 与 COL10A1 的关系, 尚未纳入细胞成熟发育过程中的其他基因。因此, COX - 2 与软骨细胞发育成熟的分子机制尚需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 王苏龙, 李强, 杨光, 王悦书. 多发内生性软骨瘤病 (Ollier 病) 一例 [J]. 中华手外科杂志, 2020, 36 (1): 36 - 37.
- [2] 陆锦炜, 陈曦, 叶陈毅, 等. 骨性关节炎中的软骨下骨囊肿: 软骨下骨异常重建 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23 (32): 5209 - 5215.
- [3] CARON M M J, CASTERMANS T M R, VAN RIETBERGEN B, et al. Impairment of cyclo - oxygenase - 2 function results in abnormal growth plate development and bone microarchitecture but does not affect longitudinal growth of the long bones in skeletally immature mice [J]. Cartilage, 2021, 12 (3): 387 - 398.
- [4] TEIXEIRA - DA - SILVA J J, NUNES - MOREIRA H S, SILVA C O, et al. Chronic administration of sildenafil improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats by decreasing COX - 2 expression and oxidative stress [J]. Life Sci, 2019, 15 (225): 29 - 38.

- [5] CARON M M, EMANS P J, SANEN K, et al. The role of prostaglandins and COX - enzymes in chondrogenic differentiation of ATDC5 progenitor cells [J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153162.
- [6] 郑志远, 卑明健, 张柳. COX - 2 选择性抑制剂在骨关节炎中作用的研究进展 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2019, 22(2): 182 - 186.
- [7] 许晓伟, 王凯. 人參多糖联合塞来昔布对骨关节炎大鼠的影响研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 306(4): 55 - 58.
- [8] KHAN M A, KHAN M J. Nano - gold displayed anti - inflammatory property via NF - κ B pathways by suppressing COX - 2 activity [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 46(sup1): 1149 - 1158.
- [9] 刘笑笑, 沈振国, 赵荣权, 等. 血小板反应蛋白 - 1 对人牙周膜成纤维细胞表达 IL - 6 及 COX - 2 的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(4): 550 - 556.
- [10] 葛安兴, 傅方洁, 贾德功, 等. 肿瘤细胞来源胞外体的形态学参数分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(4): 321 - 324.
- [11] 付聪敏, 王敏, 徐松涛, 等. 槐果碱的镇痛、抗炎作用及其对 COX - 2/PGE₂ 信号通路的影响 [J]. 中国药房, 2019, 19(13): 1775 - 1780.
- [12] 徐永明, 高智, 肖良, 等. HIF - 1 α 和 COX - 2 在力学诱导大鼠终板软骨细胞退变模型中的表达及意义 [J]. 赤峰学院学报(自然科学版), 2017, 7(33): 23 - 25.
- [13] SUN L, CHEN K, JIANG Z, et al. Indometacin inhibits the proliferation and activation of human pancreatic stellate cells through the downregulation of COX - 2 [J]. Oncol Rep, 2018, 39(5): 2243 - 2251.
- [14] 赖鑫, 陈智华, 范希萍, 等. 纤维蛋白胶复合物促进犬骨折愈合的临床学观察 [J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(4): 66 - 72.
- [15] 李金鹏, 刘涛, 何志军, 等. 消肿止痛剂对大鼠膝骨性关节炎软骨中 AMPK/mTOR 信号通路影响的实验研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(2): 231 - 235.
- [16] 张先启. 环氧合酶 - II (COX - 2) 对大鼠骨折愈合的影响实验研究 [D]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2015.
- [17] LI D, ZHONG S, ZHU Z, et al. LncRNA MAFK - AS1 promotes the progression of bladder cancer by targeting the miR - 143 - 3p/COX - 2 axis [J]. Pathobiology, 2020, 87(6): 345 - 355.
- [18] JAYASURIYA C T, HU N, LI J, et al. Molecular characterization of mesenchymal stem cells in human osteoarthritis cartilage reveals contribution to the OA phenotype [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 7044.
- [19] DESANCÉ M, CONTENTIN R, BERTONI L, et al. Chondrogenic differentiation of defined equine mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood for use in cartilage repair therapy [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): 537.
- [20] 李娜. 体外软骨内骨化 COX - 2 与 COL10A1 基因表达及软骨细胞肥大成熟的相关性研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2016.
- [21] CONEJO - GARCIA J R. Breaking barriers for T cells by targeting the EPHA2/TGF - β /COX - 2 axis in pancreatic cancer [J]. J Clin Invest, 2019, 29(9): 3521 - 3523.
- [22] ZHANG X, LIANG H, LIU W, et al. A novel sequence variant in COL10A1 causing spondylometaphyseal dysplasia accompanied with coxa valga: a case report [J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(30): e16485.
- [23] KIRSCHNECK C, KÜCHLER E C, WOLF M, et al. Effects of the highly COX - 2 - selective analgesic NSAID etoricoxib on human periodontal ligament fibroblasts during compressive orthodontic mechanical strain [J]. Mediators Inflamm, 2019, 2019: 2514956.

(收稿日期: 2021-08-31 本文编辑: 吕宁)