doi:10.11659/jjssx.11E021128

·基础研究·

塞来昔布对去卵巢骨质疏松症的保护机制研究

王 彧,阿尖措,王德元 (青海红十字医院骨科二病区,青海 西宁 810000)

[摘 要] **目的** 探讨塞来昔布对骨代谢稳态和骨质疏松症的作用。**方法** 体外培养骨髓来源巨噬细胞(BMDM)、RAW264.7和MC3T3-E1。采用CCK-8试剂盒检测不同浓度塞来昔布对BMDM和MC3T3-E1细胞活力的影响;采用抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)染色检测塞来昔布对破骨细胞分化形成的影响;采用实时聚合酶链反应(RT-PCR)检测BMDM和MC3T3-E1细胞中活化T-细胞核因子1(NFATc1)、TRACP、组织蛋白酶K(CTSK)、降钙素受体(CTR)、BMP-2、Runx2和碱性磷酸酶(ALP)mRNA水平;采用Western blot检测细胞p-NF-κB、NF-κB、NFAT和GAPDH的表达水平。采用荧光素酶报告基因试验检测BMDM中NF-κB和NFAT活性。采用卵巢切除术构建骨质疏松症小鼠模型,雌性C57BL/6J小鼠30只随机分为对照组、模型组、塞来昔布低剂量(12.5 mg/kg)组、塞来昔布中剂量(25 mg/kg)组和塞来昔布高剂量(50 mg/kg)组,每组6只,分别以相应剂量的溶剂或药物灌胃进行干预处理。采用微计算机断层扫描(micro-CT)扫描各组小鼠胫骨,分析骨微结构参数变化。**结果** 塞来昔布可抑制破骨细胞分化,但并不影响细胞活力。塞来昔布可抑制RNANKL诱导的NFATc1、TRACP、CTSK和CTR mRNA表达,并抑制p-NF-κB和NFAT蛋白表达及NF-κB和NFAT活性。塞来昔布可促进成骨细胞增殖,并促进BMP-2、Runx2和ALP mRNA表达。与模型组比较,塞来昔布低剂量组、塞来昔布中剂量组和塞来昔布高剂量组小鼠骨体积/总体积(BV/TV)和骨小梁数目(Tb.N)显著增加($P<0.01$),骨小梁分离度(Tb.Sp)显著减小($P<0.01$)。**结论** 塞来昔布可以抑制破骨细胞分化,促进成骨细胞增殖,改善骨质疏松症小鼠的骨微结构,对骨质疏松症具有潜在的治疗活性。

[关键词] 塞来昔布;骨质疏松症;骨重塑;骨代谢
[中图分类号] R580 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-11-23

Protective mechanism of celecoxib on ovariectomized osteoporosis

WANG Yu, A Jian-cuo, WANG De-yuan (Second Ward, Department of Orthopedics, Qinghai Red Cross Hospital, Xining Qinghai 810000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of celecoxib on bone metabolism homeostasis and osteoporosis. **Methods** Bone marrow-derived macrophages (BMDM), RAW264.7 and MC3T3-E1 were cultured in vitro. CCK-8 kit was used to detect the effects of different concentrations of celecoxib on the viability of BMDM and MC3T3-E1 cells. Tartrate resistant acid phosphatase (TRACP) staining was used to detect the effect of celecoxib on the differentiation and formation of osteoclasts. Real time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 (NFATc1), TRACP, cathepsin K (CTSK), calcitonin receptor (CTR), BMP-2, Runx2 and alkaline phosphatase (ALP) mRNA levels in BMDM and MC3T3-E1 cells. Western blot was used to detect the expression levels

[基金项目] 青海省卫生计生委科研课题(2017-wjzdx-37)

[14] Sun Y, Lai X, Yu Y, et al. Inhibitor of DNA binding 1 (Id1) mediates stemness of colorectal cancer cells through the Id1-c-Myc-PLAC8 axis via the Wnt/β-catenin and Shh signaling pathways[J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 6855 – 6869. doi: 10.2147/CMAR.S207167.

[15] Li L, Wei X, Wu B, et al. siRNA-mediated knockdown of ID1 disrupts Nanog-and Oct-4-mediated cancer stem cell-likeness and resistance to chemotherapy in gastric cancer cells[J]. Oncol Lett, 2017, 13(5): 3014 – 3024. doi: 10.3892/ol.2017.5828.

[16] Cook PJ, Thomas R, Kingsley PJ, et al. Cox-2-derived PGE2 induces Id1-dependent radiation resistance and self-renewal in experimental glioblastoma[J]. Neuro Oncol, 2016, 18(10): 1379 – 1389. doi: 10.1093/neuonc/now049.

[17] Darweesh RS, Ayoub NM, Nazzal S. Gold nanoparticles and angiogenesis: molecular mechanisms and biomedical applications[J]. Int J Nanomedicine, 2019, 14: 7643 – 7663. doi: 10.2147/IJN.S223941.

[18] 赵郭盛,晏铮剑,高自然,等. 分化抑制因子1通过调控VEGF-A表达促进骨肉瘤血管生成[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(9): 813 – 821. doi: 10.16016/j.1000 – 5404.202101012.

[19] Su YJ, Gao LJ, Teng LC, et al. Id1 enhances human ovarian cancer endothelial progenitor cell angiogenesis via PI3K/Akt and NF-κB/MMP-2 signaling pathways[J]. J Transl Med, 2013, 11(1): 1 – 8. doi: 10.1186/1479 – 5876 – 11 – 132.

[20] 张 涛,王 辉,杨晓文. 脑胶质瘤中Id1与VEGF的表达及其与肿瘤血管生成的关系[J]. 解剖学研究, 2018, 40(5): 390 – 393. doi: 10.3969/j.issn.1671 – 0770.2018.05.005.

[21] De Kock L, Freson K. The (Patho) biology of SRC Kinase in platelets and megakaryocytes[J]. Medicina (Kaunas), 2020, 56(12): 633. doi: 10.3390/medicina56120633.

[22] Belli S, Esposito D, Servetto A, et al. c-Src and EGFR inhibition in molecular cancer therapy: what else can we improve? [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(6): 1489. doi: 10.3390/cancers12061489.

(编辑:刘 艺)

of p-NF-κB, NF-κB, NFAT and GAPDH in cells. Luciferase reporter gene assay was used to detect the activity of NF-κB and NFAT in BMDM. Ovariectomy was used to establish the mouse model of osteoporosis, 30 female C57BL/6J mice were randomly divided into the control group, the model group, the celecoxib low-dose (12.5 mg/kg) group, the celecoxib medium-dose (25 mg/kg) group and the celecoxib high-dose (50 mg/kg) group, with 6 mice in each group, and the corresponding doses of solvent or drug were administered to the stomach for intervention respectively. Micro-CT was used to scan the tibia of mice in each group, and the changes of bone microstructure parameters were analyzed. **Results** Celecoxib could inhibit the differentiation of osteoclasts, but did not affect the cell viability. Celecoxib could inhibit the expression of NFATc1, TRACP, CTSK and CTR mRNA induced by RNANKL, and inhibit the expression of p-NF-κB and NFAT protein and the activity of NF-κB and NFAT. Celecoxib could promote the proliferation of osteoblasts, and promote the expression of BMP-2, Runx2 and ALP mRNA. Compared with the model group, the bone volume/tissue volume (BV/TV) and trabecular bone number (Tb.N) of the mice in the celecoxib low-dose group, the celecoxib medium-dose group and the celecoxib high-dose group were significantly increased ($P<0.01$), while the trabecular bone separation (Tb.Sp) was significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusion** Celecoxib can inhibit the differentiation of osteoclasts, promote the proliferation of osteoblasts, improve the bone microstructure of osteoporotic mice, and it has potential therapeutic activity for osteoporosis.

Keywords: celecoxib; osteoporosis; bone remodeling; bone metabolism

骨重塑是由成骨细胞介导的骨形成与破骨细胞介导的骨吸收所形成的动态平衡[1]。绝经后骨质疏松症是一种与衰老有关的常见病,主要发生于绝经后妇女,由于雌激素缺乏导致骨量减少及骨组织结构变化,易出现病理性骨折,严重影响患者的生活质量[2]。针对骨吸收和骨形成介导的骨重塑是治疗绝经后骨质疏松症的重要策略。目前,临床上抑制骨吸收的药物主要有雌激素、二膦酸盐、降钙素等,但这些药物通常具有潜在的副作用,对于绝经后骨质疏松症的治疗并不理想,故临床迫切需要寻找新的治疗药物[3-4]。

破骨细胞是一种造血干细胞/多核巨细胞的单核细胞,其刺激和分化主要由核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)配体(receptor activator of NF-κB ligand, RANKL)的受体激活剂调节。RANKL 主要通过各种信号通路(如 NF-κB、AKT、MAPK 和 JNK)促进破骨细胞的分化,是一种调节骨代谢的重要细胞因子[5-6]。有研究发现,活化 T-细胞核因子 1(nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1, NFATc1)是 RANKL 介导的破骨细胞分化的关键转录因子[7]。NFATc1 可以诱导与破骨细胞分化有关的各种基因的转录,如组织蛋白酶 K(cathepsin K, CTSK)、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRACP)和降钙素受体(calcitonin receptor, CTR)等[7]。

塞来昔布是一种高度选择性的环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)抑制剂,可通过减少前列腺素的形成来发挥抗炎和镇痛作用[8]。塞来昔布是唯一获得美国食品药品监督管理局批准的 COX-2 抑制剂,临床用于缓解骨关节炎和成人类风湿关节炎的症状和体征,或治疗成人急性疼痛。有研究发现,塞来昔布灌胃可以调节大鼠骨代谢稳态[9]。但塞来昔布对骨代谢调节的具体作用和机制尚不清楚,因此,本研究探讨塞来昔布对骨代谢稳态的影响及其对骨质疏松症的保护作用,以期为临床提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂、细胞与动物

塞来昔布购自湖北鑫润德化工有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、α-极限必需培养基(α-minimum essential medium, α-MEM)均购自美国 Hyclone公司;巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)购自美国 Sigma 公司;p-NF-κB、NF-κB、活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T-cells, NFAT)、GAPDH 和辣根素过氧化酶(horseradish peroxidase, HRP)标记抗兔抗体均购自美国 CST 公司。RAW264.7 和 MC3T3-E1 细胞均购自美国典型培养物保藏中心,并培养于含 10% FBS 和 100 U/mL青霉素/链霉素的 α-MEM 中。SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠[生产许可证号:SCXK(青)2021-0003] 30 只,购自青海省实验动物中心,饲养于 SPF 级动物房,所有动物实验均经过我院伦理委员会批准(20210318086)。

1.2 细胞培养

小鼠骨髓来源巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMDM)分离于 C57BL/6 小鼠的股骨和胫骨骨髓,培养于 α-MEM(含 10% FBS、2 mmol/L L-谷氨酰胺和 100 U/mL 青霉素/链霉素)中,并添加 M-CSF。

1.3 细胞活力检测

将 BMDM 培养于 96 孔板(6×10^3个/孔)中,加入 M-CSF(25 ng/mL)培养,然后用不同浓度(0 μmol/L、

2 μmol/L、4 μmol/L、8 μmol/L、10 μmol/L 和 20 μmol/L)的塞来昔布处理 5 d。于第 5 天加入 CCK-8 并避光孵育 2 h,然后用酶标仪于 450 nm 处测量吸光度值,计算细胞活力。

1.4 破骨细胞形成检测

将 BMDM 培养于 24 孔板(8×10^4 个/孔)中,随机分为对照组、RANKL 组、RANKL + 8 μmol/L 组、RANKL + 10 μmol/L 组和 RANKL + 20 μmol/L 组,对照组加入 α-MEM 培养基,其余各组加入含 RANKL(50 ng/mL)的 α-MEM 培养基;RANKL + 8 μmol/L 组、RANKL + 10 μmol/L 组和 RANKL + 20 μmol/L 组再分别加入不同浓度(8 μmol/L、10 μmol/L 和20 μmol/L)的塞来昔布干预。每 2 d 更换一次培养液,第 5 天固定细胞并进行 TRACP 染色,拍照观察破骨细胞生成情况(破骨细胞具有 3 个以上的细胞核)。

1.5 实时聚合酶链反应(real time polymerase chain reaction,RT-PCR)

将 BMDM 培养于 6 孔板(1×10^5 个/孔)中,给予 M-CSF(25 ng/mL)和 RANKL(50 ng/mL)处理,然后加入不同浓度(8 μmol/L、10 μmol/L 和 20 μmol/L)的塞来昔布干预 5 d。将 MC3T3-E1 细胞培养于 6 孔板(1.5×10^5 个/孔)中,随机分为对照组、8 μmol/L 组、10 μmol/L 组和 20 μmol/L 组,分别加入 α-MEM 培养基以及 8 μmol/L、10 μmol/L 和 20 μmol/L 的塞来昔布干预 48 h。根据说明书用Trizol裂解液提取细胞总 RNA,按照说明书用逆转录试剂盒将 1 μg RNA 逆转录成 cDNA。根据说明书采用 SYBR 染料试剂盒进行荧光定量,AB StepOne plus RT-PCR system 仪器于 95 ℃预变性 5 min,95 ℃变性 10 s,60 ℃延伸 30 s,共 40 个循环,最后根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量,以 β-actin 作为内参。引物均由上海生工生物工程有限公司合成和提供,引物序列见表 1。

1.6 荧光素酶报告基因试验

根据说明书将稳定转染 NF-κB 和 NFAT 荧光素酶报告基因的 RAW264.7 细胞培养于 48 孔板中,随机分为对照组、RANKL 组、RANKL + 8 μmol/L 组、RANKL + 10 μmol/L 组和 RANKL + 20 μmol/L 组。对照组加入 α-MEM 培养基进行处理;RANKL 组加入 RANKL(50 ng/mL)处理 24 h;RANKL + 8 μmol/L 组、RANKL + 10 μmol/L 组和 RANKL + 20 μmol/L 组预先用不同浓度(8 μmol/L、10 μmol/L 和 20 μmol/L)的塞来昔布处理 1 h,然后加入 RANKL(50 ng/mL)处理 24 h,检测 NF-κB 和 NFAT 活性。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列
NFATc1	正向:5'-AGATGGTGCTGTCTGGCCATAACT-3'
	反向:5'-TGCGGAAAGGTGGTATCTCAACAA-3'
TRACP	正向:5'-GCCAAGATGGATTCATGGGTGG-3'
	反向:5'-CAGAGACATGATGAAGTCAGCG-3'
CTSK	正向:5'-ATGTGAACCATGCAGTGTTGGTGG-3'
	反向:5'-ATGCCGCAGGCGTTGTTCTTATTC-3'
CTR	正向:5'-TGGTTGAGGTTGTGCCCA-3'
	反向:5'-CTCGTGGGTTTGCCTCATC-3'
BMP-2	正向:5'-AGCTGCAAGAGACACCCTTT-3'
	反向:5'-CATGCCTTAGGGATTTTGGA-3'
Runx2	正向:5'-AGGGAATAGAGGGGATGCATTAG-3'
	反向:5'-AAGGGAGGACAGAGGGAAACA-3'
ALP	正向:5'-AACCAGACACAAGCATTCC-3'
	反向:5'-CCAGCAAGAAGAAGCCTTTG-3'
β-actin	正向:5'-GGCACCACACCTTCTACAATG-3'
	反向:5'-GGGGTGTTGAAGGTCTCAAAC-3'

1.7 Western blot

将稳定转染 NF-κB 和 NFAT 荧光素酶报告基因的 RAW264.7 细胞按照 1.6 步骤处理,采用 Western blot 检测细胞中 p-NF-κB、NF-κB、NFAT 的表达水平。细胞裂解后提取细胞总蛋白,采用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离样品,然后转移到 PVDF 膜上。室温下将膜于 5% 脱脂牛奶中封闭1 h,然后将其与一抗(p-NF-κB、NF-κB、NFAT 和 GAPDH,按 1∶1 000 稀释)于 4 ℃摇晃孵育过夜,与二抗(HRP 标记抗兔抗体,按 1∶10 000 稀释)于室温孵育2 h,然后用 ECL 试剂曝光显影。

1.8 去卵巢骨质疏松症小鼠模型构建及放射学分析

雌性 C57BL/6J 小鼠 30 只随机分为对照组、模型组、塞来昔布低剂量(12.5 mg/kg)组、塞来昔布中剂量(25 mg/kg)组和塞来昔布高剂量(50 mg/kg)组,每组 6 只。参考文献[10]用 10% 水合氯醛麻醉小鼠,并切除卵巢,术后 1 周对照组和模型组灌胃 0.9% 生理盐水,塞来昔布低剂量组灌胃 12.5 mg/kg 塞来昔布,塞来昔布中剂量组灌胃 25 mg/kg 塞来昔布,塞来昔布高剂量组灌胃 50 mg/kg 塞来昔布,每天 1 次,连续 6 周。对小鼠进行安乐死,分离胫骨,固定在 4% 多聚甲醛中 24 h。采用微计算机断层扫描(micro-CT,Skyscan,比利时)进行放射学分析,每个像素的电压、电流和分辨率分别设置为 50 kV、400 μA 和 8.88 μm,定量计算骨体积/总体积(bone volume/tissue volume,BV/TV)值、骨小梁分离度(trabecular bone separation,Tb.Sp)和骨小梁数目(trabecular bone number,Tb.N)。

1.9 统计学处理

所有数据均采用 GraphPad Prism 5.0 软件分析,计量数据均满足独立性、正态性、方差齐性,以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,体外对照组与 RANKL 组及体内对照组与模型组比较采用两独立样本 t 检验;体外

RANKL 组或对照组与各剂量组及体内模型组与低、中、高剂量组比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,$P<0.01$ 为差异有极显著统计学意义。

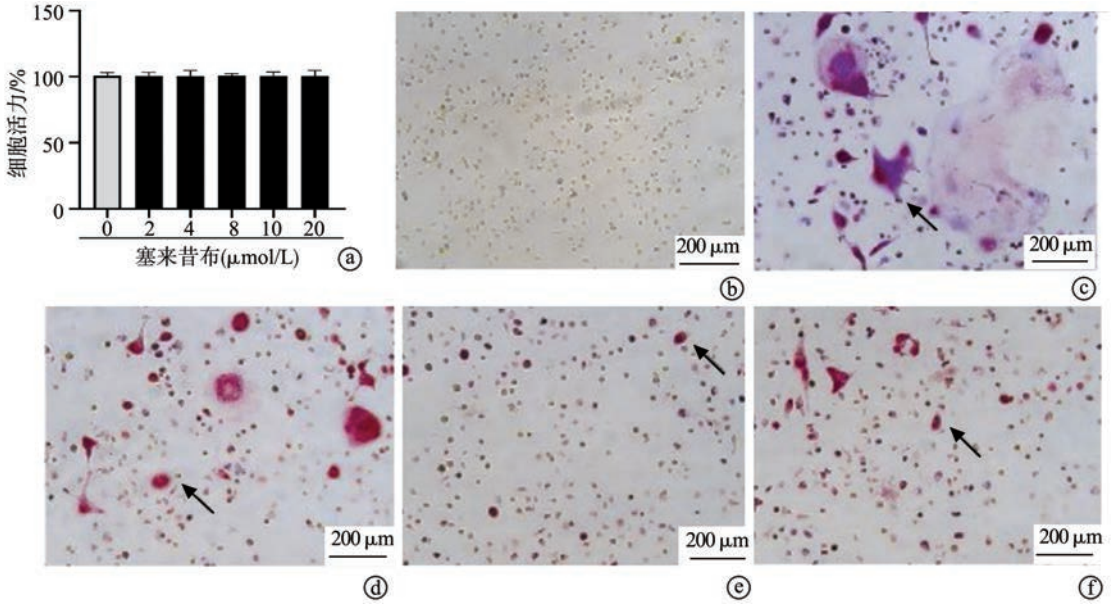
2 结果

2.1 塞来昔布对 BMDM 细胞活力和破骨细胞形成的影响

BMDM 细胞活力检测结果显示,与对照组(0 μmol/L)比较,不同浓度(2 μmol/L、4 μmol/L、8 μmol/L、10 μmol/L 和 20 μmol/L)的塞来昔布处理 5 d不影响细胞活力,因此选取最高的 3 个浓度(8 μmol/L、10 μmol/L 和 20 μmol/L)用于后续研究,见图 1a。TRACP 染色结果显示,与对照组比较,RANKL 可诱导 BMDM 生成破骨细胞;但相较于 RNAKL 组,RANKL + 8 μmol/L 组、RANKL + 10 μmol/L 组和 RANKL + 20 μmol/L组的破骨细胞生成明显减少,见图 1b ~ f。

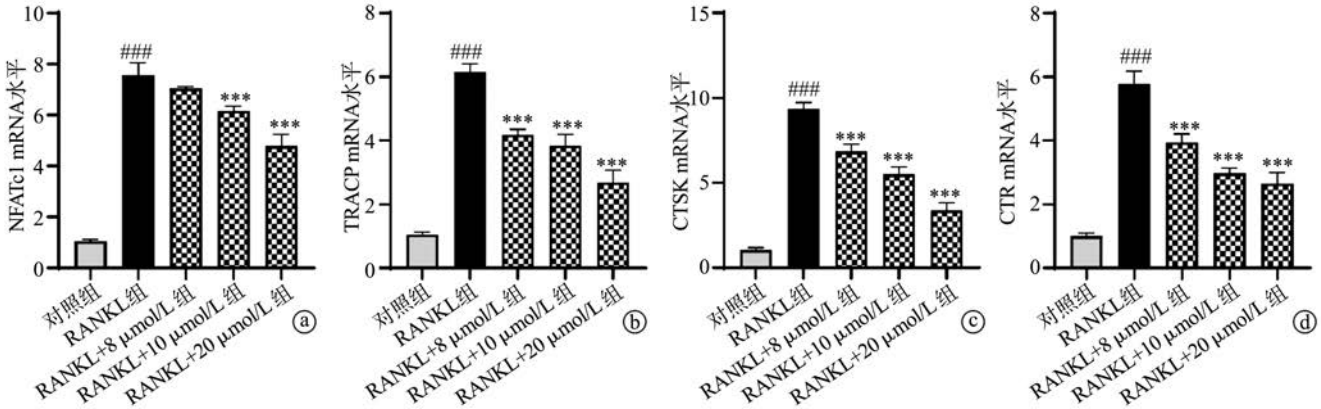
2.2 塞来昔布抑制 RANKL 诱导破骨细胞相关基因的表达

与对照组比较,RANKL 组细胞中 NFATc1、TRACP、CTSK 和 CTR mRNA 水平显著增加($P<0.001$);与 RANKL 组比较,RANKL + 10 μmol/L 组和 RANKL + 20 μmol/L组细胞中 NFATc1、TRACP、CTSK 和 CTR mRNA水平显著下降($P<0.001$),RANKL + 8 μmol/L 组中细胞 TRACP、CTSK 和 CTR mRNA 水平显著下降($P<0.001$),见图 2。



a:BMDM 细胞活力;b:对照组;c:RANKL 组;d:RANKL + 8 μmol/L 组;e:RANKL + 10 μmol/L 组;f:RANKL + 20 μmol/L 组 黑色箭头:破骨细胞

图 1 塞来昔布对 BMDM 细胞活力和破骨细胞形成的影响

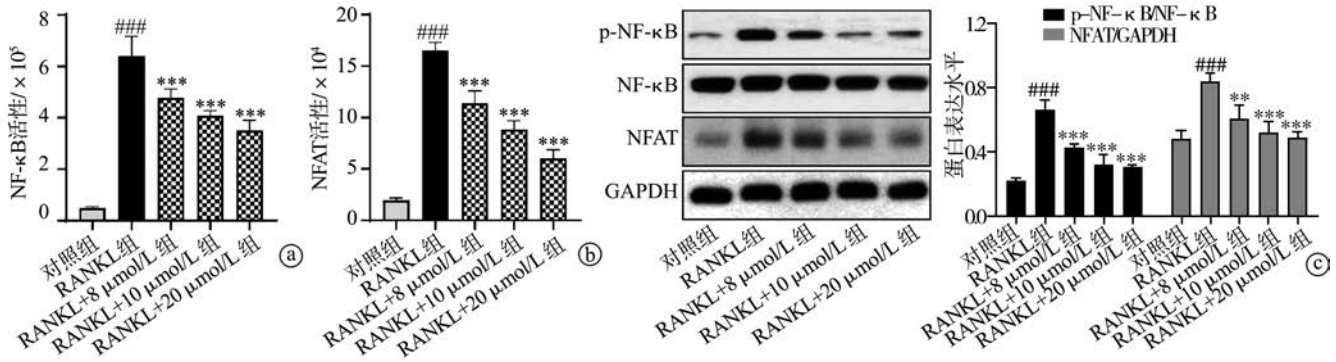


a:BMDM 细胞中 NFATc1 mRNA 水平;b:BMDM 细胞中 TRACP mRNA 水平;c:BMDM 细胞中 CTSK mRNA 水平;d:BMDM 细胞中 CTR mRNA 水平 ###:与对照组比较,$P<0.001$;***:与 RNAKL 组比较,$P<0.001$

图 2 塞来昔布对破骨细胞相关基因表达的影响

2.3 塞来昔布抑制 RANKL 诱导 NF-κB 和 NFAT 的表达

荧光素酶报告基因试验结果显示,与对照组比较,RANKL 组细胞中 NF-κB 和 NFAT 活性明显增强($P<0.001$);但相较于 RANKL 组,RANKL+8 μmol/L 组、RANKL+10 μmol/L 组和 RANKL+20 μmol/L 组细胞中 NF-κB 和 NFAT 活性明显降低($P<0.001$),见图 3a、b。Western blot 结果显示,与对照组比较,RANKL 组细胞中 p-NF-κB 和 NFAT 蛋白表达明显增强;但相较于 RANKL 组,RANKL+8 μmol/L 组、RANKL+10 μmol/L 组和 RANKL+20 μmol/L 组细胞中 p-NF-κB 和 NFAT 蛋白表达明显降低,见图 3c。

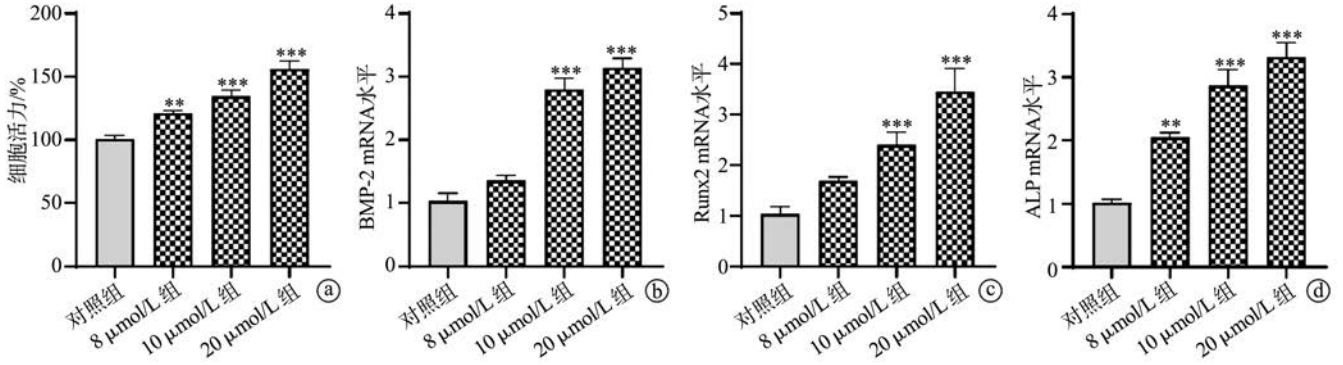


a:RAW264.7 细胞中 NF-κB 活性;b:RAW264.7 细胞中 NFAT 活性;c:RAW264.7 细胞中 p-NF-κB 和 NFAT 的蛋白表达 ###:与对照组比较,$P<0.001$;**:与 RANKL 组比较,$P<0.01$;***:与 RANKL 组比较,$P<0.001$

图 3 塞来昔布对 NF-κB 和 NFAT 活性和表达的影响

2.4 塞来昔布对成骨细胞增殖和成骨相关基因表达的影响

细胞活力检测结果显示,与对照组比较,用不同浓度(8 μmol/L、10 μmol/L 和 20 μmol/L)的塞来昔布处理 MC3T3-E1 细胞可以明显促进细胞增殖,见图 4a。与对照组比较,10 μmol/L 组和 20 μmol/L 组细胞中 BMP-2、Runx2 和 ALP mRNA 表达水平均升高($P<0.001$),8 μmol/L组仅 ALP mRNA 表达水平升高($P<0.01$),见图 4b~d。



a:MC3T3-E1 细胞活力;b:MC3T3-E1 细胞中 BMP-2 mRNA 水平;c:MC3T3-E1 细胞中 Runx2 mRNA 水平;d:MC3T3-E1 细胞中 ALP mRNA 水平 **:与对照组比较,$P<0.01$;***:与对照组比较,$P<0.001$

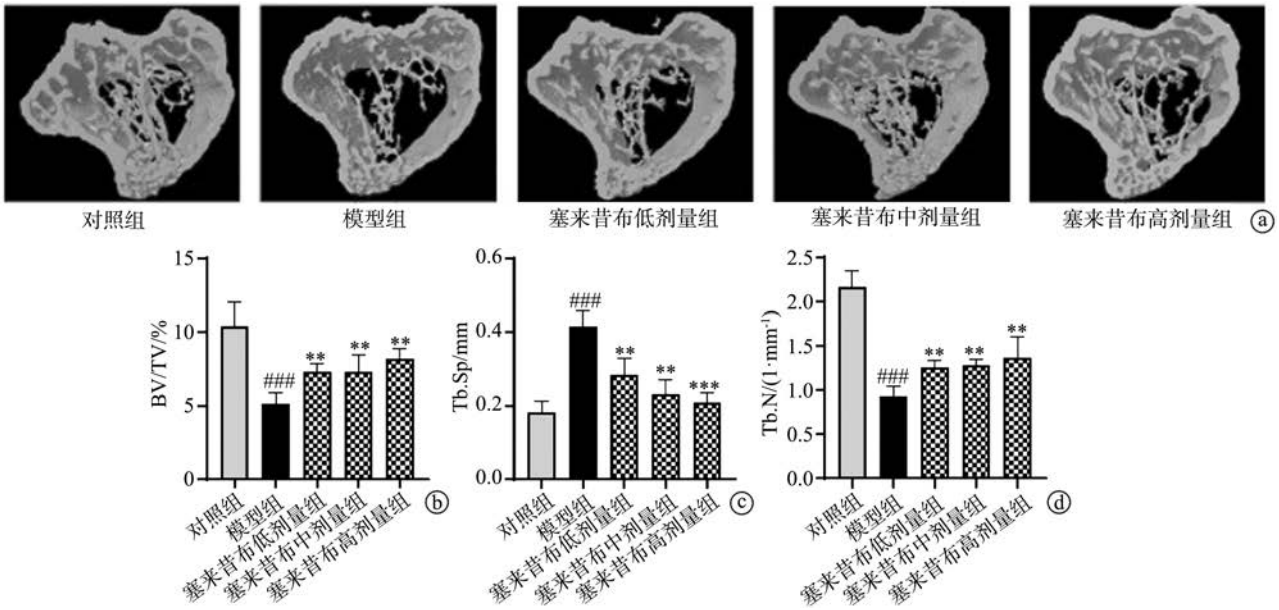
图 4 塞来昔布对成骨细胞增殖和成骨相关基因表达的影响

2.5 塞来昔布对去卵巢小鼠骨丢失的影响

体内实验结果显示,与对照组比较,模型组小鼠 BV/TV和 Tb.N 显著减小($P<0.001$),Tb.Sp 显著增加($P<0.001$);但与模型组比较,塞来昔布低剂量组、塞来昔布中剂量组和塞来昔布高剂量组小鼠 BV/TV 和 Tb.N 显著增加($P<0.01$),Tb.Sp 显著减小($P<0.01$),见图 5。

3 讨论

骨质疏松症主要与成骨细胞介导的骨形成与破骨细胞介导的骨吸收间的稳态有关,通常是由破骨细胞的骨吸收超过成骨细胞的骨形成而引起[11]。破骨细胞的过度骨吸收是由较高的RANKL水平和相关下游



a:各组小鼠 miro-CT 图片;b:BV/TV;c:Tb. Sp;d:Tb. N ###:与对照组比较,$P<0.001$;**:与模型组比较,$P<0.01$;***:与模型组比较,$P<0.001$

图 5 塞来昔布对去卵巢小鼠骨丢失的影响

基因的表达增强引起的,该途径已成为治疗溶骨性疾病的主要靶标[12]。二膦酸盐通过抑制破骨细胞的功能来保护骨骼,但具有下颌骨坏死和肾功能衰竭等风险。有研究发现,多种中草药活性成分可抑制破骨细胞的分化并缓解骨质疏松症,但其成药性比较缓慢[13]。塞来昔布是一种选择性 COX-2 抑制剂,已被批准用于临床治疗骨关节炎和类风湿性关节炎,有研究发现塞来昔布可以调节骨代谢稳态[9]。本研究结果显示,塞来昔布可以抑制破骨细胞形成,并能够促进成骨细胞增殖,对去卵巢骨质疏松症具有潜在的治疗作用。

为了研究塞来昔布对破骨细胞分化的作用和机制,本研究首先提取了小鼠 BMDM 细胞,结果显示,塞来昔布可抑制 BMDM 向破骨细胞分化,但不影响 BMDM细胞活力。RANKL 属于肿瘤坏死因子,是破骨细胞形成的关键细胞因子[14]。RANKL 与受体 RANK 结合后可以激活 NF-κB、TRAF 和 NFATc1 等信号通路,并调节破骨细胞的分化[15]。NF-κB 信号通路是 RANKL 诱导破骨细胞分化的重要途径,RANKL 与 RANK 结合后可促进 IKKα 和 IKKβ 磷酸化,从而诱导 IκB 降解并引起 NF-κB 活化[16]。本研究结果显示,塞来昔布通过抑制 NF-κB 磷酸化来抑制 NF-κB 的转录活性,表明塞来昔布可以抑制经典的 NF-κB 通路。NFATc1 是破骨细胞分化的关键转录因子,NF-κB 激活后可诱导 NFATc1 活化,NFATc1 也可调节和控制破骨细胞分化标记基因(如 CTSK、TRACP 和 CTR 等)的表达[17]。本研究结果显示,塞来昔布可以抑制 NFATc1 的蛋白表达和转录活性。目前尚不能确定塞来昔布是否可直接抑制 NFATc1 的活性或间接抑制 NF-κB 的活性。但本研究发现,塞来昔布可以显著降低破骨细胞相关蛋白 NFATc1、CTSK、TRACP 和 CTR mRNA 的表达。上述结果表明塞来昔布可通过阻断 NF-κB 和 NFATc1 介导的信号通路抑制破骨细胞的分化。

不同浓度的塞来昔布可促进小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 增殖,具有促进骨形成作用。Runx2 是 RUNXX 家族的成员之一,作为成骨细胞特异的转录因子,对成骨细胞的分化和成熟具有重要作用[18]。Runx2 基因敲除在小鼠生长过程中可以诱导体内骨骼完全丧失。Runx2 与成骨细胞的主要细胞外基质基因的表达密切相关,如碱性磷酸酶、骨钙素、Ⅰ型胶原、骨唾液蛋白和骨桥蛋白[19]。另外,有研究发现,BMP 和 Runx2 信号通路可调节成骨细胞的增殖和分化,并在骨形成中起关键作用,且成骨细胞还可通过调节骨保护素表达调节骨吸收,以维持骨稳态[20]。本研究结果显示,不同浓度的塞来昔布可以诱导成骨细胞 BMP-2、Runx2 和 ALP 表达,说明塞来昔布可通过调节成骨细胞分化和成熟分子的表达促进成骨细胞增殖,其可能具有潜在的抗骨质疏松症活性。因此,本研究采用卵巢切除术构建去卵巢骨质疏松症小鼠模型,探讨塞来昔布抗骨质疏松症的体内活性。

卵巢切除术动物是一种常见的绝经后骨质疏松症

体内研究模型,广泛应用于绝经后骨质疏松症的病理和药物干预研究[21]。骨稳态失调可以触发骨矿物质密度的丢失,从而导致骨质疏松症。去卵巢诱导的小鼠表现出明显降低的骨矿物质密度和异常的骨小梁结构特性[22]。因此,本研究构建去卵巢小鼠模型探究塞来昔布抗骨质疏松症的体内活性,结果显示,与对照组比较,模型组小鼠 BV/TV 和 Tb. N 显著减小,Tb. Sp 显著增加,说明本研究成功建立了骨质疏松症小鼠模型;进一步研究发现,塞来昔布明显改善了去卵巢小鼠的骨微结构。这些结果说明塞来昔布具有抗骨质疏松症的体内活性,其作用机制可能与调节骨吸收和骨形成间的代谢平衡有关。

综上所述,本研究发现 COX-2 抑制剂塞来昔布具有潜在的抗骨质疏松症活性,并与调节骨代谢有关。但塞来昔布治疗骨质疏松症的具体靶点或直接的信号通路尚不清楚,仍需进一步探讨。

[参考文献]

[1] 刘 波,陈祥和,杨 康,等. 骨代谢紊乱的表观遗传重编程与运动调控[J]. 中国组织工程研究,2021,25(20):3210 - 3218. doi:10.3969/j. issn. 2095 - 4344. 3209.

[2] Zhao X,Cui P,Hu G,et al. PIP5k1β controls bone homeostasis through modulating both osteoclast and osteoblast differentiation[J]. J Mol Cell Biol,2020,12(1):55 - 70. doi:10.1093/jmcb/mjz028.

[3] Stefanick ML. Estrogens and progestins:background and history,trends in use,and guidelines and regimens approved by the US food and drug administration[J]. Am J Med,2005,118:64 - 73. doi:10.1016/j.amjmed.2005.09.059.

[4] Miller PD. Non-vertebral fracture risk reduction with oral bisphosphonates:challenges with interpreting clinical trial data[J]. Curr Med Res Opin,2008,24:107 - 119. doi:10.1185/030079908x253681.

[5] Boyle WJ,Simonet WS,Lacey DL,et al. Osteoclast differentiation and activation[J]. Nature,2003,423:337 - 342. doi:10.1038/nature01658.

[6] Baud'huin M,Duplomb L,Velasco CR,et al. Key roles of the OPG-RANK-RANKL system in bone oncology[J]. Expert Rev Anticancer Ther,2007,7:221 - 232. doi:10.1586/14737140.7.2.221.

[7] Takayanagi H,Kim S,Koga T,et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts[J]. Dev Cell,2002,3:889 - 901. doi:10.1016/s1534 - 5807(02)00369 - 6.

[8] 郭宗儒. 塞来昔布和 COX-2 选择性抑制剂[J]. 药学学报,2016,6:1010 - 1016. doi:10.16438/j.0513 - 4870.2014 - 1060.

[9] Liu Y,Cui Y,Chen Y,et al. Effects of dexamethasone,celecoxib,and methotrexate on the histology and metabolism of bone tissue in healthy Sprague Dawley rats[J]. Clin Interv Aging,2015,10:1245 - 1253. doi:10.2147/CIA.S85225.

[10] Park E,Lee CG,Lim E,et al. Osteoprotective effects of loganic acid on osteoblastic and osteoclastic cells and osteoporosis-induced mice[J]. Int J Mol Sci,2020,22(1):233. doi:10.3390/ijms22010233.

[11] Lacombe J,Cairns BJ,Green J,et al. The effects of age,adiposity,and physical activity on the risk of seven site-specific fractures in postmenopausal women[J]. J Bone Miner Res,2016,31(8):1559 - 1568. doi:10.1002/jbmr.2826.

[12] Lee CH,Kwak SC,Kim JY,et al. Genipin inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation through proteasome-mediated degradation of c-Fos protein and suppression of NF-κB activation[J]. J Pharmacol Sci,2014,124:344 - 353. doi:10.1254/jphs.13174fp.

[13] Fumimoto R,Sakai E,Yamaguchi Y,et al. The coffee diterpene kahweol prevents osteoclastogenesis via impairment of NFATc1 expression and blocking of Erk phosphorylation[J]. J Pharmacol Sci,2012,118:479 - 486. doi:10.1254/jphs.11212fp.

[14] Crotti TN,Smith MD,Weedon H,et al. Receptor activator NF-kappaB ligand (RANKL) expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis,spondyloarthropathy,osteoarthritis,and from normal patients:semiquantitative and quantitative analysis[J]. Ann Rheum Dis,2002,61(12):1047 - 1054. doi:10.1136/ard.61.12.1047.

[15] Shi C,Hou C,Zhu X,et al. SRT1720 ameliorates sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis in rats by suppressing NF-κB signalling[J]. Biomed Pharmacother,2018,108:50 - 57. doi:10.1016/j.biopha.2018.09.035.

[16] 刘晨涛,张娟娟,苗 华,等. 负重爬梯运动调节去卵巢大鼠 OPG/Ikkα/Runx2 基因表达以及对股骨结构和生物力学的影响[J]. 中国运动医学杂志,2019,38(4):44 - 52. doi:10.16038/j.1000 - 6710.2019.04.010.

[17] 董永辉,代志鹏,胡巍然,等. 基质细胞衍生因子-1α 对破骨细胞形成和骨吸收功能的影响[J]. 中华实验外科杂志,2019,36(1):5 - 7. doi:10.3760/cma.j.issn.1001 - 9030.2019.01.002.

[18] 吴顺义,张晓蓉. Runx2 在成骨细胞和软骨细胞分化中作用的研究进展[J]. 医学综述,2019,25(7): 1302 - 1307. doi:10.3969/j.issn.1006 - 2084.2019.07.011.

[19] 王 斌,麦彩园,谢胜德,等. Wnt/β-catenin,BMP-2/Runx2/Osterix,OPG/RANKL,LGR4/RANKL 通路的相关因子在绝经后骨质疏松性骨折中的表达[J]. 中国骨质疏松杂志,2020,26(11): 1577 - 1583. doi:10.3969/j.issn.1006 - 7108.2020.11.004.

[20] Lim HJ,Park SI,Bak SG,et al. Beneficial effects of vigna angularis extract in osteoporosis and osteoarthritis[J]. Food Sci Nutr,2020,8(12):6550 - 6556. doi:10.1002/fsn3.1944.

[21] You S,Liu S,Dong X,et al. Intravaginal administration of human type Ⅲ collagen-derived biomaterial with high cell-adhesion activity to treat vaginal atrophy in rats[J]. ACS Biomater Sci Eng,2020,6(4):1977 - 1988. doi:10.1021/acsbiomaterials.9b01649.

[22] Tao ZS,Zhou WS,Xu HG,et al. Parathyroid hormone (1-34) can reverse the negative effect of valproic acid on the osseointegration of titanium rods in ovariectomized rats[J]. J Orthop Translat,2020,27:67 - 76. doi:10.1016/j.jot.2020.10.006.

(编辑:贺绍梅)