

# 美洛昔康对骨形态发生蛋白 9 诱导间充质干细胞骨向分化的抑制作用

周龙洋, 杨秋珺, 牟钰钦, 刘映孜, 周岐新, 蒋青松, 何百成  
(重庆医科大学药理学教研室, 重庆 400016)

**摘要:**目的 探讨美洛昔康对骨形态发生蛋白 9(BMP 9) 诱导间充质干细胞成骨分化的影响。方法 用 BMP 9 编码序列的重组腺病毒感染 C3H10T1/2 细胞, 并同时加入美洛昔康 5, 10 和 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  对 BMP9 的作用进行干预。采用化学发光法检测第 5 天、第 7 天和第 9 天的碱性磷酸酶 (ALP) 活性, RT-PCR 方法分别于第 9 天和第 11 天检测骨钙蛋白 mRNA 表达以及第 1 天、第 3 天和第 5 天 Dlx-5 mRNA 表达, 于第 14 天和第 20 天采用茜素红 S 染色法检测钙盐沉积。另用荧光素酶报告质粒检测 BMPR-Smad 信号的转录活性。结果与正常 C3H10T1/2 细胞组相比, 第 5~9 天 BMP9 组 ALP 活性明显增加 ( $P < 0.01$ ), 但加入美洛昔康 5, 10 和 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  后, ALP 活性随美洛昔康浓度增加而明显降低 ( $P < 0.05$ )。与正常 C3H10T1/2 细胞组相比, BMP9 组骨钙蛋白和 Dlx-5 的 mRNA 表达水平及钙盐沉积明显增加, 美洛昔康则明显抑制 BMP9 诱导的骨钙蛋白和 Dlx-5 mRNA 的表达及钙盐沉积 ( $P < 0.05$ )。BMP9 促进 C3H10T1/2 细胞中 BMPR-Smad 报告质粒的荧光素酶活性增加 ( $P < 0.01$ ), 美洛昔康能够抑制 BMP9 对 BMP-Smad 信号的活化作用 ( $P < 0.05$ )。结论 美洛昔康对 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨化有明显的抑制作用, 其机制可能与抑制 BMP-Smad 信号激活有关。

**关键词:** 美洛昔康; 骨形态发生蛋白 9; 间充质干细胞; 成骨分化; Smad 信号转导

**中图分类号:** R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2012)03-0321-06

**DOI:** 10.3867/j.issn.1000-3002.2012.03.012

近年来研究表明, 环氧酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 在干细胞成骨分化、骨折的修复和愈合中具有重要作用。选择性 COX-2 抑制剂能抑制和延迟骨折愈合, COX-2<sup>-/-</sup> 小鼠胫骨骨折愈合明显延迟, 且颅骨的膜内成骨量明显减少<sup>[1-2]</sup>。骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMP) 属于转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 超家族成员, 在个体发育过程中具有重要作用, 包括对骨发育的影响<sup>[3]</sup>。间充质干细胞是一种具有多向分化潜能的干细胞, 在适当因子刺激下能向骨、软骨、肌肉及脂肪细胞分化<sup>[4]</sup>。文献报道, BMP2 具有明显诱导间充质干细胞成骨分化的能力, 但 BMP2 不能有效诱导 COX-2<sup>-/-</sup> 小鼠来源的骨髓间充质细胞成骨分化<sup>[5]</sup>。

BMP9 是目前发现的 BMP 成员中, 诱导干细胞

成骨分化能力最强的因子<sup>[6]</sup>。至今尚无相关文献报道 COX-2 在 BMP9 诱导干细胞成骨分化过程中的作用。美洛昔康 (meloxicam) 是一种选择性 COX-2 抑制剂, 因不良反应较小而广泛用于临床。本研究采用 COX-2 抑制剂美洛昔康, 通过体外实验研究 COX-2 在 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化过程中的作用, 为深入研究 COX-2 与 BMP9 诱导干细胞成骨分化的关系提供理论及实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、试剂及仪器

间充质干细胞 C3H10T1/2 购自美国 American Type Culture Collection 公司。美洛昔康购自 Sigma-Aldrich 公司, 采用二甲亚砜 (DMSO, 购自碧云天, ST038) 作为溶剂。C3H10T1/2 细胞培养采用 DMEM 培养基培养 (含 10% 胎牛血清、青霉素 100  $\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$  和链霉素 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 培养条件为 5%  $\text{CO}_2$  及 37 $^{\circ}\text{C}$ 。碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 化学发光检测试剂盒购自 BD Clontech (Cat#631737), 采用 Promega 光度计 (GloMax 20/20) 测定。茜素红 S (alizarin red S) 购自成都格雷西亚化学技术有限公司, Lipofectamine 购自美国 Invitrogen

**基金项目:** 国家自然科学基金项目资助 (81071462); 重庆市自然科学基金项目资助 (CSTC, 2011BB5129)

**作者简介:** 周龙洋 (1986 -), 男, 硕士研究生。何百成 (1972 -), 男, 副教授, 博士, 主要从事干细胞生物学、再生医学和分子药理学研究。

**通讯作者:** 何百成, E-mail: hebaicheng99@yahoo.com, Tel: 13310218650

公司。

### 1.2 BMP9 和绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 重组腺病毒构建

重组腺病毒均采用 AdEasy 系统<sup>[7]</sup> 构建,由芝加哥大学 TC He(何通川)教授提供。构建方法如下:从 EST 克隆中用 PCR 将目的基因的编码序列扩增,然后克隆到穿梭质粒。最后将穿梭质粒线性化并与含腺病毒骨架序列的质粒进行重组,将重组正确的质粒线性化并转染到 HEK-293A 细胞进行病毒包装,得到目的基因编码序列的重组腺病毒。即 GFP 重组腺病毒 (Ad-GFP) 和 BMP9 重组腺病毒 (Ad-BMP9)。

### 1.3 细胞分组及腺病毒滴度测定

C3H10T1/2 细胞分为正常对照组、美洛昔康组、BMP9 组及 BMP9 合并美洛昔康组。正常对照组用 Ad-GFP 处理并同时给予 1% DMSO。美洛昔康组用不同浓度的美洛昔康合并 Ad-GFP 处理细胞。BMP9 组用 Ad-BMP9 感染细胞并同时给予 1% DMSO 处理细胞。BMP9 合并美洛昔康为 Ad-BMP9 感染细胞并同时给予不同浓度的美洛昔康。实验前每种腺病毒均需进行滴度测定(相对滴度),按如下方法进行:首先将目的细胞按实验要求种于 24 孔板,待细胞贴壁后,分别加入 0.5, 1, 2, 4, 8 和 16  $\mu\text{l}$  病毒液于孔板中;24 h 后,进行荧光观察,确定达到要求感染效率(30%) 每孔应加入腺病毒液的体积。

### 1.4 化学发光法测定碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性

按 1.3 项分组处理细胞,美洛昔康的浓度分别为 5, 10 和 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。参照文献[8] 方法,做适当改进用以测定 ALP 活性。先吸去培养基,每孔加入 100  $\mu\text{l}$  裂解液,裂解 5 min,然后收集裂解液,离心弃沉淀。反应体系组成为 5  $\mu\text{l}$  裂解液 + 15  $\mu\text{l}$  缓冲液 + 5  $\mu\text{l}$  底物。室温下孵育 25 min 后用 Promega 光度计测定 ALP 活性。另用 BCA 法测定蛋白浓度,用以校正 ALP 活性。ALP 活性以生成对硝基苯酚的量表示,即  $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  蛋白。

### 1.5 茜素红 S 染色检测钙盐沉积

按 1.3 项分组处理细胞,美洛昔康浓度为 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。于给药后第 14 天和第 20 天参照文献[9] 进行茜素红 S 染色检测钙盐沉积。弃培养基后用 PBS 洗清 1 次,用 2.5% 的戊二醛固定 10 min,吸去固定液后用 PBS (pH 4.2) 清洗 2 次。用 2% 的茜素红 S 染液处理细胞 20 min,然后用 PBS (pH 4.2) 清洗 2 次,对染色结果进行扫描(出现红色结节为阳性

结果)。

### 1.6 RT-PCR 法检测骨钙蛋白 (osteocalcin, OCN) 和 Dlx-5 mRNA 的表达

将指数生长的细胞种于 T25 培养瓶中,贴壁后按 1.3 细胞分组方法加入 DMSO, Ad-GFP, Ad-BMP9 和美洛昔康 5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。提取总 RNA 前 24 h,将完全培养基换为含 1% 胎牛血清的完全培养基。采用异硫氰酸胍-酚-氯仿法提取总 RNA,通过 RT-PCR 制备 cDNA,利用 PCR 检测目的基因表达情况。所用 PCR 引物如下:GAPDH 上游 5'-GGCTGCC CAGAACATCAT-3',下游 5'-CGGACACATTGGGGGTAG-3'; Dlx-5 上游 5'-CTCAGCCAC-CACCCTCAT-3',下游 5'-TGGCAGGTGGGAATTGAT-3'; OCN 上游 5'-CCAAGCAGGAGGGCAATA-3',下游 5'-TCGTCACAAGCAGGGTCA-3'。将 PCR 产物进行电泳并成像,利用 ImageJ 进行光密度值测定,结果表示为目的基因条带吸光度值 (absorbance, A) 与对应内参 A 的比值。

### 1.7 BMPR-Smad 报告质粒检测 BMPR-Smad 信号的激活

将指数生长状态的细胞种于 T25 培养瓶中,待细胞贴壁后,用 Lipofectamine 转染 BMPR-Smad 报告质粒 (p12  $\times$  SBE-Luc) 3  $\mu\text{g}$ , 4 h 后换液。12 h 后将细胞消化重新种于 24 孔板,细胞贴壁后按 1.3 细胞分组方法加入 DMSO, Ad-GFP, Ad-BMP9 和美洛昔康 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。24 h 后,裂解细胞并按照试剂盒说明进行荧光素酶活性测定。BCA 法测定总蛋白浓度,对荧光素酶活性进行校正。荧光素酶相对活性用各组测定值与对照组测定值的比值表示,间接反映信号通路的激活程度。

### 1.8 统计学分析

所有实验均重复 3 次。实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,利用 *t* 检验进行组间比较。

## 2 结果

### 2.1 美洛昔康对 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞 ALP 活性的影响

表 1 结果显示,与正常对照组相比,美洛昔康 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  对正常 C3H10T1/2 细胞 ALP 活性有抑制作用 ( $P < 0.05$ ); BMP9 能明显诱导间充质干细胞 C3H10T1/2 的 ALP 活性增加,第 7 天的活性达峰值 ( $P < 0.01$ )。BMP9 + 美洛昔康组 ALP 活性较 BMP9 组在不同时间点均有明显降低 ( $P < 0.01$ ),并有明显的量效关系 ( $r_{d7} = 0.9536$ ,  $P < 0.05$ )。

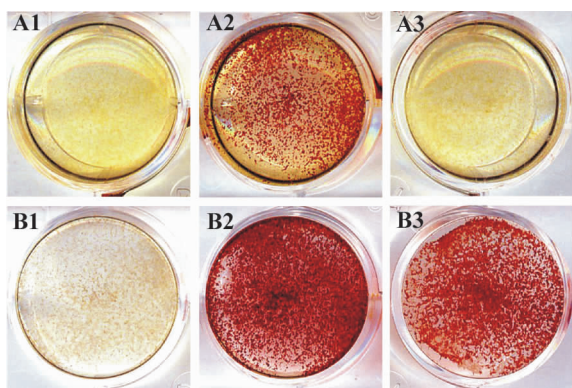
**Tab. 1 Effect of meloxicam on alkaline phosphatase (ALP) activity in C3H10T1/2 cells induced by recombinant bone morphogenetic protein 9 (BMP 9) adenovirus**

Group	ALP activity /nmol·s <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> protein		
	d 5	d 7	d 9
Normal control	0.429 ± 0.039	0.540 ± 0.022	0.405 ± 0.016
Meloxicam 5 μmol·L <sup>-1</sup>	0.414 ± 0.013	0.440 ± 0.018	0.339 ± 0.014
10 μmol·L <sup>-1</sup>	0.352 ± 0.014	0.379 ± 0.021	0.304 ± 0.017
20 μmol·L <sup>-1</sup>	0.229 ± 0.018 *	0.303 ± 0.033 *	0.224 ± 0.024 *
BMP9	6.917 ± 0.145 **	12.33 ± 0.414 **	8.638 ± 0.290 **
BMP9 + meloxicam 5 μmol·L <sup>-1</sup>	4.799 ± 0.042 **#	7.082 ± 0.201 **#	5.737 ± 0.166 **#
10 μmol·L <sup>-1</sup>	2.064 ± 0.069 **##	4.279 ± 0.160 **##	3.423 ± 0.123 **##
20 μmol·L <sup>-1</sup>	0.571 ± 0.026 ##	1.234 ± 0.090 **##	1.024 ± 0.074 **##

$\bar{x} \pm s, n=3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with normal control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with BMP9 group.

### 2.2 美洛昔康对 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞钙盐沉积的影响

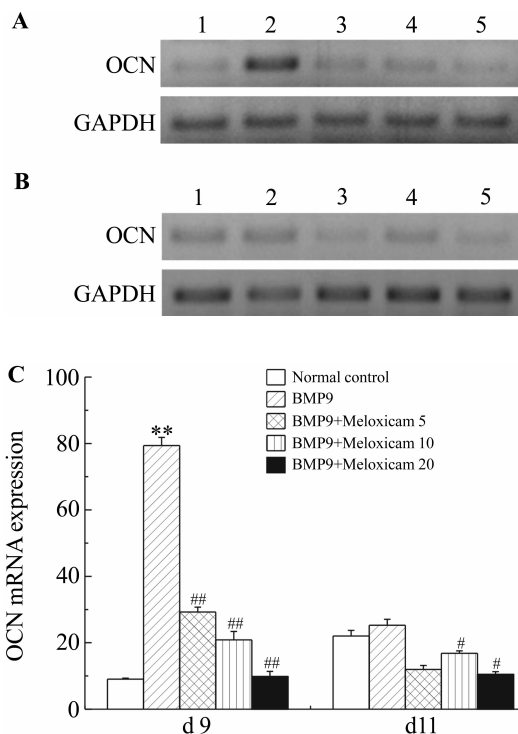
图 1 结果显示,间充质干细胞 C3H10T1/2 经 BMP9 诱导后,第 14 天和第 20 天钙盐沉积与 GFP 对照组相比显著增强;但 BMP9 + 美洛昔康 20 μmol·L<sup>-1</sup>组钙盐沉积较 BMP9 组明显减弱。提示美洛昔康对 BMP9 在 C3H10T1/2 细胞中诱导的钙盐沉积具有明显的抑制作用。



**Fig. 1 Effect of meloxicam on matrix mineralization in C3H10T1/2 cells induced by BMP9.** On d 14 (A) and d 20 (B) after treatment, cells were subjected to alizarin red S staining for matrix mineralization test. 1: normal control; 2: BMP9; 3: BMP9 + meloxicam 20 μmol·L<sup>-1</sup>.

### 2.3 美洛昔康对 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞 OCN mRNA 表达的影响

图 2 结果显示,与正常对照组相比,BMP9 明显诱导 C3H10T1/2 细胞 OCN mRNA 表达( $P < 0.01$ )。BMP9 + 美洛昔康组,第 9 天(图 2A, C)和第 11 天(图 2B) OCN mRNA 表达水平较 BMP9 组明显下降( $P < 0.01$ ),表明美洛昔康对 BMP9 诱导



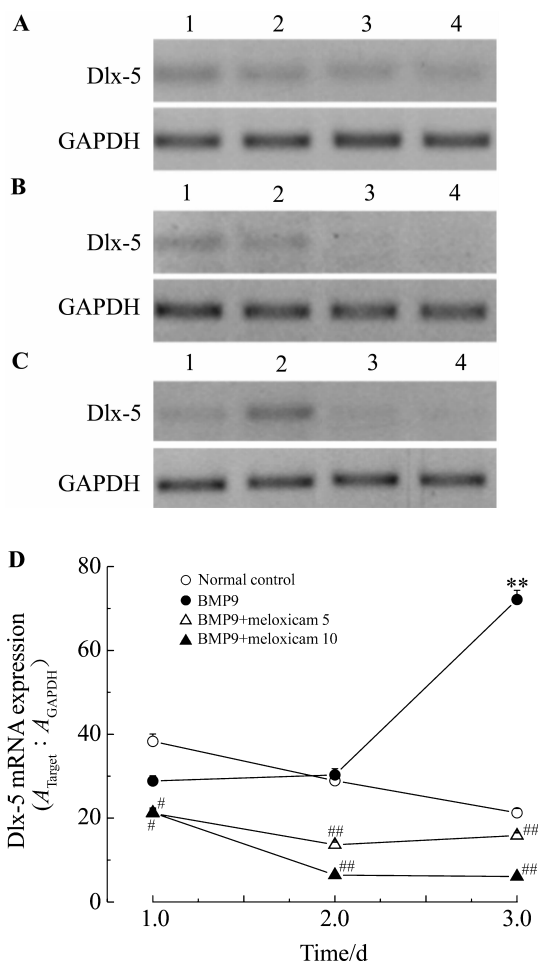
**Fig. 2 Effect of meloxicam on osteocalcin (OCN) mRNA expression induced by BMP9 in C3H10T1/2 cells on d 9 (A) and d 11 (B).** Lane 1: normal control; lane 2: BMP9; lane 3: BMP9 + meloxicam 5 μmol·L<sup>-1</sup>; lane 4: BMP9 + meloxicam 10 μmol·L<sup>-1</sup>; lane 5: BMP9 + meloxicam 20 μmol·L<sup>-1</sup>. C was the semi-quantitative result of A - B.  $\bar{x} \pm s, n=3$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with normal control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with BMP9 group.

C3H10T1/2 细胞 OCN mRNA 的表达有明显的抑制作用。

### 2.4 美洛昔康对 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞 Dlx-5 表达的影响

图 3 结果显示, C3H10T1/2 细胞经 BMP9 诱

导, *Dlx-5* 表达水平较正常对照组明显增加; BMP9 + 美洛昔康组, *Dlx-5* mRNA 表达水平较 BMP9 组明显降低。提示美洛昔康抑制 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化作用, 可能与抑制成骨分化早期的转录调节因子 *Dlx-5* 表达有关。



**Fig. 3** Effect of meloxicam on *Dlx-5* mRNA expression in C3H10T1/2 cells induced by BMP9 on the first (A), the third (B) and the fifth day (C) after treatment. Lane 1: normal control; lane 2: BMP9; lane 3: BMP9 + meloxicam 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; lane 4: BMP9 + meloxicam 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . D was the semiquantitative result of A - C.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with normal control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with BMP9 group.

### 2.5 美洛昔康对 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞 BMPR-Smad 报告质粒荧光素酶活性的影响

表 2 结果显示, BMP9 在 C3H10T1/2 细胞中, 能使 BMPR-Smad 报告质粒的荧光素酶活性较 GFP 对照组明显升高 ( $P < 0.01$ ); BMP9 + 美洛昔康组, BMPR-Smad 报告质粒荧光素酶活性较 BMP9 组明显降低 ( $P < 0.05$ )。提示 BMP9 能够激活 BMP-Smad 信号, 促使 BMPR-Smad 报告质粒荧光素酶活性升高; 美洛昔康能够抑制 BMP9 对 BMP-Smad 信号的活化, 从而抑制 BMPR-Smad 报告质粒荧光素酶活性升高。

**Tab. 2** Effect of meloxicam on increasing BMPR-Smad reporter luciferase activity in C3H10T1/2 cells induced by BMP9

Group	BMPR-Smad reporter luciferase activity
Normal control	1.00 $\pm$ 0.05
BMP9	13.84 $\pm$ 0.01 **
BMP9 + meloxicam 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	9.43 $\pm$ 0.03 *#

C3H10T1/2 cells were transfected with BMPR-Smad reporter plasmid (p12XSBE-Luc) in T25 flask. The medium was changed after 4 h. The cells were replaced 12 h after transfection. Control cells were treated with Ad-GFP and DMSO, cells in other groups were treated with Ad-BMP9 and DMSO, and Ad-BMP9 was combined with meloxicam 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Twenty-four hours later, the cells were lysed for firefly luciferase activity assay. Total protein was tested with BCA to normalize the firefly luciferase activities.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with normal control group; #  $P < 0.05$ , compared with BMP9 group.

### 3 讨论

本研究发现, 美洛昔康能明显抑制 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化, 提示 COX-2 在 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化过程中具有重要作用。

BMP 属于 TGF- $\beta$  超家族成员之一, 目前已分离和鉴定了 20 余种。BMP 是具有多种生物学功能的形态原, 不但在胚胎时期对骨组织的发育和成年时期对骨缺损修复具重要作用, 而且还参与机体某些疾病的发生过程<sup>[3]</sup>。BMP 可通过经典的 BMP-Smad 通路进行信号转导, 即 BMP 与相应的受体 (BMP I 型和 II 型受体) 结合后, 导致下游成骨性 Smad 1, Smad 5 和 Smad 8 磷酸化, 继而与 Smad4 形成复合物并转位入核, 调节下游特定目的基因表达, 如 Runx2, Osterix 和 *Dlx-5* 等<sup>[10-11]</sup>。Kang 等<sup>[9]</sup>系统分析了 BMP2 至 BMP15 共 14 种 BMPs, 发现除传统的 BMP2 和 BMP7 外, BMP4, BMP6 和 BMP9 也具有诱导间充质干细胞成骨分化的作用, 其中 BMP9 诱导间充质干细胞 C3H10T1/2 成骨分化作用明显强于其他 BMP 成员。BMP2 与 BMP7 重组蛋白已经用于临床, 治疗骨不连接等相关疾病<sup>[12-13]</sup>; BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的作用明显强于 BMP2 及 BMP7, 具有较大的潜在临床应用价值。因此, 研究 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的机制及影响因素具有重要意义。

COX-1 在正常骨组织及受损骨组织中均有表达, 而 COX-2 则只在骨受损后修复的早期表达增加<sup>[14]</sup>, 提示 COX-2 在骨损伤修复过程中可能具有重要作用。Zhang 等<sup>[5]</sup>研究表明, COX-1<sup>(-/-)</sup> 小鼠骨折愈合没有明显影响, 但 COX-2<sup>(-/-)</sup> 小鼠不但骨折愈合明显延迟, 而且 COX-2<sup>(-/-)</sup> 小鼠来源的骨髓

间充质细胞成骨分化也受到抑制; Bradley 等<sup>[15]</sup>通过体内实验发现 COX-2 抑制剂对辛伐他汀诱导的 BMP2 表达及成骨功能有抑制作用。Lau 等<sup>[16]</sup>报道, COX-2 与 BMP4 在体外能协同诱导间充质干细胞成骨分化。Damrongsri 等<sup>[17]</sup>报道, COX-2 抑制剂能抑制 BMP6 的表达, 影响骨再生。Spiro 等<sup>[18]</sup>证实, COX-2 抑制剂能抑制 BMP7 促进骨折修复的功能和 BMP7 诱导的异位成骨。提示 COX-2 在干细胞成骨分化及骨损伤修复过程中具有重要作用, 并且与 BMP2, BMP4, BMP6 及 BMP7 的关系密切。本实验结果表明, BMP9 能明显诱导间充质干细胞成骨分化, COX-2 选择性抑制剂美洛昔康对 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化具有明显抑制作用; 美洛昔康可能与通过抑制 BMP9 对 BMP-Smad 信号的激活, 使成骨分化早期重要的转录调节因子 Dlx-5 表达受到抑制有关。

由于目前缺乏相关的文献报道, 所以本实验利用 COX-2 选择性抑制剂美洛昔康进行体外实验, 初步验证 COX-2 对 BMP9 诱导干细胞成骨分化的重要性。后续研究将进一步对 COX-2 进行沉默表达和基因敲除, 通过体外细胞实验及体内异位成骨实验, 进一步确证 COX-2 对 BMP9 诱导干细胞成骨分化的重要性, 并研究 COX-2 与 BMP9 之间的相互关系, 为组织骨工程及临床合理用药提供理论及实验依据。

致谢: 感谢美国 Rochester 大学陈迪教授提供 BMP9-Smad 报告质粒及芝加哥大学何通川教授提供重组腺病毒载体。

#### 参考文献:

- [1] Vuolteenaho K, Moilanen T, Moilanen E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase-2 and the bone healing process [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2008, **102**(1):10-14.
- [2] Leonelli SM, Goldberg BA, Safanda J, Bagwe MR, Sethuratnam S, King SJ. Effects of a cyclooxygenase-2 inhibitor (rofecoxib) on bone healing[J]. *Am J Orthop* (Belle Mead NJ), 2006, **35**(2):79-84.
- [3] Hong CC, Yu PB. Applications of small molecule BMP inhibitors in physiology and disease [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009, **20**(5-6):409-418.
- [4] Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, *in vitro* expansion and characterization [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2006, (174):249-282.
- [5] Zhang X, Schwarz EM, Young DA, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair [J]. *J Clin Invest*, 2002, **109**(11):1405-1415.
- [6] Kang Q, Sun MH, Cheng H, Peng Y, Montag AG, Deyrup AT, *et al.* Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery[J]. *Gene Ther*, 2004, **11**(17):1312-1320.
- [7] Luo J, Deng ZL, Luo X, Tang N, Song WX, Chen J, *et al.* A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system [J]. *Nat Protoc*, 2007, **2**(5):1236-1247.
- [8] Rosalki SB, Foo AY, Burlina A, Prellwitz W, Stieber P, Neumeier D, *et al.* Multicenter evaluation of Iso-ALP test kit for measurement of bone alkaline phosphatase activity in serum and plasma [J]. *Clin Chem*, 1993, **39**(4):648-652.
- [9] Kang Q, Song WX, Luo Q, Tang N, Luo J, Luo X, *et al.* A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, **18**(4):545-559.
- [10] Chen L, Jiang W, Huang J, He BC, Zuo GW, Zhang W, *et al.* Insulin-like growth factor 2 (IGF-2) potentiates BMP-9-induced osteogenic differentiation and bone formation[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, **25**(11):2447-2459.
- [11] Zhang Y, Wen W, Lou ZY. BMP9 Induces osteogenic differentiation of multipotent stem cell [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 2009, **36**(10):1291-1298.
- [12] Tsuda H, Wada T, Yamashita T, Hamada H. Enhanced osteoinduction by mesenchymal stem cells transfected with a fiber-mutant adenoviral BMP2 gene [J]. *J Gene Med*, 2005, **7**(10):1322-1334.
- [13] Smajilagic A, Al-Khalil MY, Redjic A, Filipovic S, Hadjihanovic B, Lappalainen S. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 and bone marrow as a substitute for bone graft in reconstruction defect of rabbit mandible[J]. *Saudi Med J*, 2005, **26**(9):1398-1402.
- [14] Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E2 signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK) ligand/RANK system[J]. *Endocrinology*, 2005, **146**(4):1991-1998.
- [15] Bradley JD, Cleverly DG, Burns AM, Helm NB, Schmid MJ, Marx DB, *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibitor reduces simvastatin-induced bone morphogenetic protein-2 and bone formation *in vivo* [J]. *J Periodontal Res*, 2007, **42**(3):267-273.

- [16] Lau KH, Gysin R, Chen ST, Wergedal JE, Baylink DJ, Mohan S. Marrow stromal cell-based cyclooxygenase 2 *ex vivo* gene-transfer strategy surprisingly lacks bone-regeneration effects and suppresses the bone-regeneration action of bone morphogenetic protein 4 in a mouse critical-sized calvarial defect model[J]. *Calcif Tissue Int*, 2009, **85**(4):356-367.
- [17] Damrongsri D, Geva S, Salvi GE, Williams RC, Limwongse V, Offenbacher S. Cyclooxygenase-2 inhibition selectively attenuates bone morphogenetic protein-6 synthesis and bone formation during guided tissue regeneration in a rat model[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2006, **17**(1):38-47.
- [18] Spiro AS, Beil FT, Baranowsky A, Barvencik F, Schilling AF, Nguyen K, *et al.* BMP-7-induced ectopic bone formation and fracture healing is impaired by systemic NSAID application in C57BL/6-mice[J]. *J Orthop Res*, 2010, **28**(6):785-791.

## Inhibitory effect of meloxicam on osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells induced by bone morphogenetic protein 9

ZHOU Long-yang, YANG Qiu-jun, MU Yu-qin, LIU Ying-zi, ZHOU Qi-xin, JIANG Qin-song, HE Bai-cheng  
(Department of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To investigate the effect of meloxicam on bone morphogenetic protein 9 (BMP9) induced osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. **METHODS** The infected C3H10T1/2 cells with BMP9 recombinant adenovirus were interfered with meloxicam 5, 10 and 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . The alkaline phosphatase activity (ALP) on day 5, day 7 and day 9 after treatment was determined. The mRNA expression of osteocalcin (OCN) was detected on day 9 and day 11 by RT-PCR, and so did the Dlx-5 mRNA on day 1, day 3 and day 5. The matrix mineralization with alizarin red S staining on day 14 and day 20 was assayed. The transcriptional activity of BMP-Smad signaling with Smad binding site luciferase reporter was measured. **RESULTS** ALP in BMP9 group was much higher than in normal control group ( $P < 0.01$ ) on day 5, day 7 and day 9, but the ALP activities were reduced when treated with BMP9 combined with meloxicam ( $P < 0.05$ ). Compared with normal control group, the mRNA expression of osteocalcin and Dlx-5 apparently increased in BMP9 group. However, the function of BMP9 was attenuated by combination with meloxicam ( $P < 0.05$ ). Compared with normal control group, the matrix mineralization in BMP9 group was increased, but decreased when BMP9 combined with meloxicam. Compared with normal control group, BMP9 promoted the firefly luciferase activities of BMP-Smad reporter plasmids in C3H10T1/2 cells ( $P < 0.01$ ), but decreased when BMP9 and meloxicam were combined ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION** Meloxicam can inhibit osteogenic differentiation induced by BMP9 in mesenchymal stem cells, which may be mediated by inhibiting the BMP-Smad signaling activation.

**Key words:** meloxicam; bone morphogenetic protein 9; mesenchymal stem cell; osteogenic differentiation; Smad signal transduction

**Foundation item:** The project supported by National Natural Science Foundation of China (81071462); Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC, 2011BB5129)

**Corresponding author:** HE Bai-cheng, E-mail: hebaicheng99@yahoo.com, Tel: 13310218650

(收稿日期: 2011-07-11 接受日期: 2011-12-26)

(本文编辑: 乔虹)