

[文章编号] 1000-1182(2009)04-0374-04

塞来昔布对Tca8113细胞环氧化酶-2 表达及诱导凋亡的作用

李伟忠¹ 王晓燕² 丁彦青²

(1.南方医科大学南方医院 口腔科; 2.病理科, 广东 广州 510515)

[摘要] 目的 观察选择性环氧化酶-2(COX-2)抑制剂塞来昔布对人舌鳞癌Tca8113细胞的生长抑制、COX-2表达调节及诱导凋亡的作用。方法 在Tca8113细胞中分别加入含有不同浓度塞来昔布的培养液,培养24、48、72 h后,采用MTT方法测定细胞生长抑制率,采用免疫组化方法观察COX-2蛋白在Tca8113细胞中的表达,应用荧光显微镜观察凋亡细胞的形态学特征,应用Annexin V-FITC/PI双标记法检测细胞的早期凋亡率,相对定量荧光定量PCR检测Tca8113细胞中COX-2 mRNA的表达。结果 COX-2蛋白在Tca8113细胞中呈强阳性表达,塞来昔布在抑制细胞生长的同时,抑制Tca8113细胞COX-2蛋白的表达;Tca8113细胞经塞来昔布处理后凋亡细胞多见,与对照组相比,塞来昔布处理组早期凋亡细胞增多有统计学意义;塞来昔布调节COX-2 mRNA表达的作用与对照组相比无统计学意义。结论 塞来昔布主要以剂量依赖的方式抑制Tca8113细胞生长,诱导细胞凋亡,其作用与抑制COX-2蛋白表达有关,而对COX-2基因作用较弱,其作用机制有待进一步研究。

[关键词] 塞来昔布; 环氧化酶-2; 细胞凋亡; 鳞状细胞癌

[中图分类号] R 739.8 **[文献标志码]** A

Effect of Celecoxib on cyclooxygenase-2 expression and inducing apoptosis in Tca8113 cell lines LI Wei-zhong¹, WANG Xiao-yan², DING Yan-qing². (1. Dept. of Stomatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Dept. of Pathology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective** To observe whether Celecoxib could inhibit the growth, regulate the expression of COX-2 and induce apoptosis of Tca8113 cells. **Methods** Tca8113 cells were incubated with different concentrations of Celecoxib for 24, 48 and 72 h, and MTT was used to calculate growth inhibition rate. The expression of COX-2 protein and mRNA in Tca8113 cells was detected with SP immunohistochemistry staining and fluorescent quantitative real-time RT-PCR. Morphology of apoptosis cells was observed by fluorescence microscopy, and Annexin V-FITC/PI double labeling method was employed to detect early stage cell apoptosis. **Results** COX-2 protein was strongly expressed in Tca8113 cells and was suppressed by Celecoxib. The growth and proliferation of Tca8113 cells treated with Celecoxib were inhibited in a dose-dependent manner. Celecoxib treatment resulted in significant increase in apoptosis and early apoptotic rate. Fluorescent quantitative real-time RT-PCR results showed no significant effect on regulating expression of COX-2 mRNA. **Conclusion** Celecoxib shows a significant effect on inhibiting expression of COX-2 in Tca8113 cells, this is probably related to growth inhibition and inducing apoptosis of Tca8113 cells.

[Key words] Celecoxib; cyclooxygenase-2; cell apoptosis; squamous cell carcinoma

环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在恶性肿瘤组织中的强阳性表达使其在肿瘤发生、发展及转移中的作用日益受到重视,抑制COX-2的活性,探索COX-2抑制剂在恶性肿瘤防治中的作用,成为目前肿瘤研究的热点^[1-3]。本实验观察COX-2抑制剂

塞来昔布对人舌鳞癌Tca8113细胞COX-2表达及诱导凋亡的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞和主要试剂

人舌鳞状细胞癌细胞系Tca8113由上海交通大学医学院附属第九人民医院·口腔医学院建株,南方医院口腔科实验室保存,塞来昔布胶囊为辉瑞公司产品,产品批号: BK060127。Trizol试剂盒(Invitrogen公

[收稿日期] 2008-08-15; [修回日期] 2008-11-10

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(06024396)

[作者简介] 李伟忠(1962—),男,湖南人,副教授,博士

[通讯作者] 丁彦青, Tel: 020-61642148

司,美国), RT-PCR成套试剂盒(TaKaRa公司,日本), Annexin V-FITC试剂盒(碧云天公司), COX-2鼠抗人单克隆抗体(北京中杉生物有限公司), COX-2和 β -actine引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 MTT法测定塞来昔布对Tca8113细胞增殖的抑制作用

将Tca8113细胞培养于含10%灭活胎牛血清的低糖DMEM培养液中,以每孔 4×10^3 的密度接种于96孔培养板,置5%CO₂孵箱内培养24 h后,加入用低糖DMEM培养液稀释的塞来昔布,其浓度分别为2.5、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$,继续培养24、48、72 h后,测定570 nm的光密度($A_{570\text{nm}}$)值,计算细胞生长抑制率:生长抑制率(%)=[1-(实验组 $A_{570\text{nm}}$ 值/对照组 $A_{570\text{nm}}$ 值)] $\times 100\%$ 。

1.3 免疫组化观察Tca8113细胞COX-2蛋白的表达

SP免疫组化法:将细胞接种于多聚赖氨酸(1:10)处理过的玻片上,加入塞来昔布(80 $\mu\text{mol/L}$),对照组加等量PBS,培养48 h,待其长成单层后取出细胞爬片,37 $^{\circ}\text{C}$ 用95%的乙醇固定15 min;用10%正常山羊血清封闭,滴加1:100稀释的COX-2抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS冲洗。滴加生物素标记二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10~30 min。PBS冲洗。每张切片加50 μL 链酶亲和素-过氧化酶溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 或室温孵育10 min。PBS冲洗,DAB显色,室温下染色时间3~5 min。复染,脱水透明,封片。COX-2蛋白是一种由细胞合成的功能蛋白,主要在细胞浆中表达,阳性染色为粗细均匀的棕黄色颗粒,胞核一般不着色。

1.4 荧光显微镜观察Tca8113细胞的凋亡细胞的形态学特征

将Tca8113细胞以每毫升 2×10^5 个接种于50 mL的培养瓶中,24 h后分别加入含40、80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的塞来昔布,对照组加入等量培养液,继续培养24 h后收集细胞,用PBS重悬;调整细胞数为每毫升 1×10^7 个,吸取90 μL 的细胞悬液,加入吖啶橙(acridine orange, AO)染液和溴化乙锭(ethidium bromide, EB)染液各5 μL ,轻轻混匀,室温避光染色15 min后,滴加于载玻片上,加盖玻片;于荧光显微镜,滤光片观察,计数、拍照。

1.5 Annexin V-FITC/PI双标记法检测Tca8113细胞早期凋亡

调整Tca8113细胞计数至每毫升 2×10^5 个,取6 mL,接种于50 mL的培养瓶中,培养24 h后,分别加入40、80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的塞来昔布培养液,对照组加入等量培养液,24、48 h后收集细胞,将细胞悬浮PBS中,取5~10万重悬的细胞,1 000 g离心5 min;

弃上清,加入195 μL Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞;加入5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀。室温、避光孵育10 min;加入10 μL 碘化丙啶染色液,轻轻混匀,冰浴避光放置,随即进行流式细胞仪检测,用CellQuest Pro软件分析细胞凋亡情况。

1.6 相对定量荧光定量PCR进行Tca8113细胞COX-2 mRNA表达分析

将Tca8113细胞以每孔200 μL (3×10^4 个)接种于96孔培养板内,加入用低糖DMEM培养液稀释的塞来昔布,浓度为10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$,24、48 h后,收集细胞,按Trizol法提取细胞总RNA,按反转录试剂盒说明书合成cDNA,采用相对定量荧光定量PCR技术检测COX-2 mRNA及内参基因 β -actine mRNA的表达量,经标准化处理计算出不同样本COX-2 mRNA的相对表达量。采用Primer 5设计COX-2和内参基因 β -actine引物,COX-2上游引物F:5'-TTACAATGCTGACTATGGCTAC-3',下游引物R:5'-CTGATGCGTGAAGTGCTG-3',产物长度为238 bp; β -actine上游引物F:5'-CACCCAGCAC-AATGAAGAT-3',下游引物R:5'-CAAATAAAG-CCATGCCAAT-3',产物长度:255 bp,退火温度为58 $^{\circ}\text{C}$ 。应用MX3000p定量PCR仪进行相对定量荧光定量PCR实验,检测各模板的 C_t 值。通过检测 C_t 值结果进行相对定量,实验同时检测样本的内参基因 β -actine的 C_t 值和目的基因COX-2基因的 C_t 值,将目的基因的平均 C_t 值减去内参基因的平均 C_t 值得到 ΔC_t ,即 $\Delta C_t = C_t(\text{目的基因}) - C_t(\text{内参基因})$ 。再分别算出实验组的 ΔC_t 值和对照组的 ΔC_t ,实验组和对照组的基因表达相对定量则用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示,其中 $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{实验组}) - \Delta C_t(\text{对照组})$ 。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值表示实验组与对照组目的基因表达的倍比关系。所有实验均重复3次,取3次结果的平均值为实验结果。

1.7 统计学方法

应用SPSS 13.0软件包进行分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用one-way ANOVA分析,组间多重比较用LSD法。

2 结果

2.1 塞来昔布对Tca8113细胞增殖的抑制作用

各时间点,塞来昔布以剂量依赖方式抑制Tca8113细胞增殖。当塞来昔布浓度为40、80 $\mu\text{mol/L}$ 时,对Tca8113细胞增殖产生显著抑制作用(图1)。

2.2 COX-2蛋白在Tca8113细胞的表达

COX-2蛋白在Tca8113细胞呈阳性表达,但采用塞来昔布(80 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞后,在其抑制细胞生长增殖的同时,也抑制了COX-2蛋白的表达(图2)。

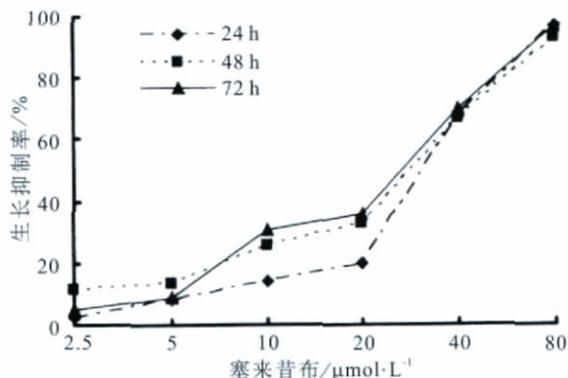
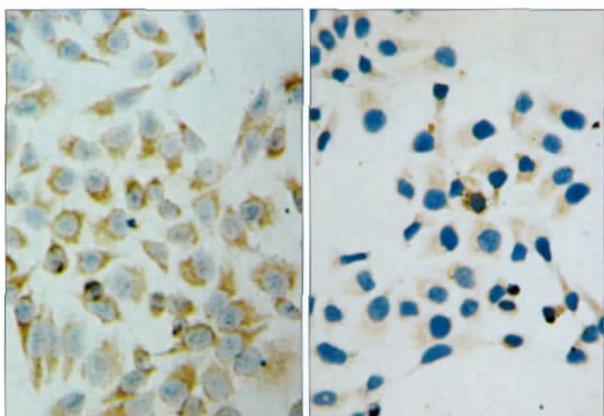


图1 Tca8113细胞经塞来昔布处理后的生长曲线

Fig 1 The growth curve of Tca8113 cell lines treated with Celecoxib



左: 对照组; 右: 塞来昔布(80 μmol/L)处理48 h

图2 COX-2蛋白在Tca8113细胞的表达 SP ×400

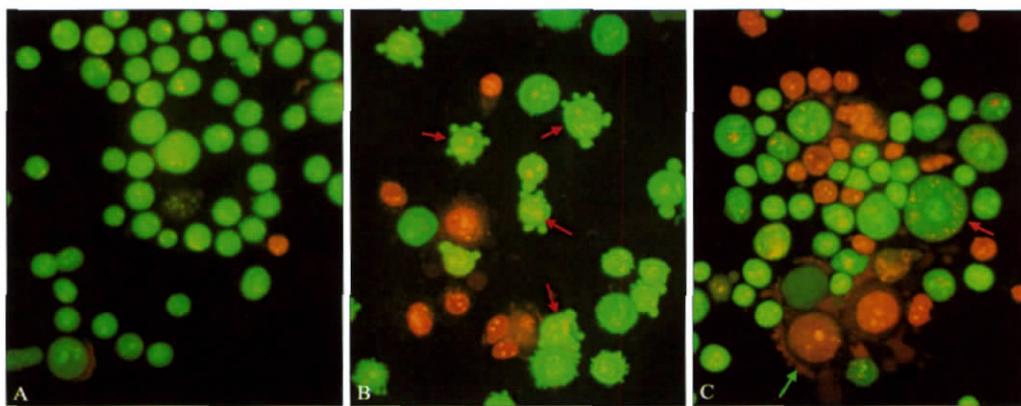
Fig 2 Expression of COX-2 protein in Tca8113 cell lines SP ×400

2.3 AO/EB荧光双染检测塞来昔布诱导Tca8113细胞凋亡的作用

塞来昔布作用Tca8113细胞24 h后, 对照组细胞不被EB染色而被AO染成绿色, 无明显凋亡细胞。实验组可见早期凋亡细胞, 细胞被AO及EB双重染色, 早期表现为细胞核被染色呈黄绿色荧光, 浓聚成新月形或颗粒状, 位于细胞的一侧。随着浓度增加, 凋亡现象明显, 表现为细胞核被EB深染呈桔红色, 核固缩和偏向, 细胞膜可见出芽、起泡以及太阳花形变化。严重时可见细胞坏死, 坏死细胞体积增大, 呈不均匀的橙红色荧光, 轮廓不清, 解体或接近解体(图3)。

2.4 Annexin V-FITC/PI双标记法检测Tca8113细胞早期凋亡

Annexin V-FITC/PI双标记法流式细胞术检测细胞早期凋亡结果显示对照组24、48 h细胞早期凋亡率分别为0%、(0.93±0.11)%; 塞来昔布40、80 μmol/L处理24 h后的早期凋亡率分别为(3.86±0.23)%、(15.26±0.88)%; 48 h后早期凋亡率分别为(7.17±0.64)%、(20.07±1.06)% , 与对照组相比, 高浓度塞来昔布组(80 μmol/L)与低浓度塞来昔布组(40 μmol/L)早期凋亡细胞增多有统计学意义(*P*均为0.000)。高浓度塞来昔布组(80 μmol/L)与低浓度塞来昔布组(40 μmol/L)相比, 在24、48 h后Tca8113细胞的早期凋亡细胞增多也有统计学意义(表1)。



A: 对照组; B: 40 μmol/L; C: 80 μmol/L

图3 Tca8113细胞凋亡细胞的核形态学变化(红箭头示凋亡细胞, 绿色箭头示死亡细胞) 荧光显微镜 ×200

Fig 3 Nuclear morphology of Tca8113 cell lines was observed (Red arrows show apoptosis cell, green arrow shows dead cell) fluorescence microscope ×200

表1 不同处理组Tca8113细胞早期凋亡率(*n*=3)

Tab 1 Early apoptotic rate of Tca8113 cell lines treated with Celecoxib(*n*=3)

| 分组 | 早期凋亡率/% | |
|------------------------------|------------|------------|
| | 24 h | 48 h |
| 对照组 | 0 | 0.93±0.11 |
| 塞来昔布/40 μmol·L ⁻¹ | 3.86±0.23 | 7.17±0.64 |
| 塞来昔布/80 μmol·L ⁻¹ | 15.26±0.88 | 20.07±1.06 |

2.5 塞来昔布对Tca8113细胞COX-2 mRNA表达的影响

细胞总RNA经逆转录成cDNA后, 通过荧光实时定量PCR检测获得样本的 ΔCt 值经方差分析表明, 各实验组Tca8113细胞COX-2 mRNA的表达与对照组之间差异无统计学意义(*P*>0.05), 经相对定量计算分析, 各实验组与对照组COX-2基因表达水平的平

均倍比关系差异无统计学意义($P>0.05$, 表2)。

表2 各实验组与对照组COX-2基因表达的 ΔCt 值及倍比关系($n=3$)

Tab 2 The ΔCt value and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ value of COX-2 mRNA expression in Tca8113 cell lines in control and Celecoxib treated group($n=3$)

| 分组 | 24 h | | 48 h | |
|--------------------------------------|---------------|--------------------------|---------------|--------------------------|
| | ΔCt 值 | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值 | ΔCt 值 | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值 |
| 对照组 | 5.80±0.32 | 1.00±0.00 | 5.76±0.39 | 1.00±0.00 |
| 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 5.84±0.72 | 0.98±0.06 | 5.97±0.58 | 0.87±0.11 |
| 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 5.89±0.65 | 0.94±0.02 | 5.99±0.51 | 0.85±0.10 |
| 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 5.92±0.74 | 0.92±0.08 | 6.02±0.34 | 0.84±0.13 |
| 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 5.88±0.60 | 0.95±0.02 | 5.95±0.34 | 0.88±0.10 |

3 讨论

COX-2的过表达与恶性肿瘤的发生、发展有关,其表达的强弱与恶性肿瘤的侵袭性、淋巴结转移及预后等有明确关系。COX-2的表达增强同样也发现在几种类型的癌前病变,如结肠直肠腺瘤、胃肠上皮化生、食管慢性炎症伴腺上皮化生、慢性肝炎、口腔白斑、肺不典型腺瘤样过度增生、乳腺原位腺管癌、前列腺上皮肉瘤、膀胱异型上皮、宫颈非典型增生和光化性角化病等,此外,长期口腔慢性炎症刺激可能导致COX-2表达增高,导致癌变发生。COX-2不仅在癌前病变和恶性组织中表达增强,在恶性病变的周围组织中同样表达增强^[2-3]。因此,选择性的调控COX-2的表达,可能成为今后预防、治疗恶性肿瘤的重要分子靶标之一。

塞来昔布是一种药效显著的治疗关节炎和骨关节炎药物,研究表明,塞来昔布不但能抑制恶性肿瘤细胞的生长、增殖,还能促进肿瘤细胞凋亡,同时能增强肿瘤细胞对抗癌药及放射线的敏感性,为恶性肿瘤的治疗开辟了新的探索领域。本实验研究发现,塞来昔布以剂量依赖关系抑制Tca8113细胞的生长。AO/EB荧光双染检测观察发现,随着塞来昔布浓度的增加,其细胞生长受到抑制的同时,细胞出现早期凋亡及中后期凋亡的变化。Annexin V-FITC/PI双标记法检测较高浓度的塞来昔布(40、80 $\mu\text{mol/L}$)处理后,Tca8113细胞早期凋亡率的增高均有统计学意义。COX-2蛋白在Tca8113细胞呈强阳性表达,经塞来昔布处理后,其生长增殖作用受到抑制的同时,也抑制了COX-2蛋白的表达,但荧光实时定量PCR检测获得样本的 ΔCt 及 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值经方差分析,塞来昔布处理组COX-2 mRNA的表达与对照组之间差异无统计学意义,提示选择性COX-2抑制剂塞来昔布对COX-2的作用,主要表现在蛋白水

平,抑制其酶的活性。

塞来昔布的抗肿瘤作用除了依赖于抑制COX-2酶的功能外,也可能存在不依赖于COX-2酶的其他途径。van Wijngaarden等^[4]通过体外细胞学及裸鼠移植瘤实验,研究塞来昔布与阿霉素联合应用对乳腺癌细胞MDA-MB231的毒性及抑瘤作用,结果发现,塞来昔布在体外及动物实验均能增强阿霉素对MDA-MB231细胞的生长抑制作用,塞来昔布能增加细胞内阿霉素的蓄积和贮留,这种作用似乎与COX-2的抑制无关,而很可能通过抑制核转录因子- κB (nuclear factor- κB , NF- κB)而发挥作用。NF- κB 与肿瘤的耐药性有关,同时也被认为是塞来昔布作用的分子靶向。肿瘤组织中NF- κB 的激活能使肿瘤细胞抗御凋亡的刺激,如化学治疗等,而塞来昔布能抑制阿霉素作用后导致的NF- κB 活性增强作用。对于塞来昔布诱导肿瘤细胞凋亡的作用机制,许多学者认为与塞来昔布激活内源性凋亡通路有关,如塞来昔布处理癌细胞后可降低抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1、Survivin的表达及增强凋亡前体蛋白Bad的表达^[4-7],促进线粒体快速释放细胞色素C,从而激活Apaf-1和Caspases 3、8、9等释放^[8-9]。此外,塞来昔布能促使肿瘤细胞内神经酰胺水平增加^[10],诱导凋亡前体蛋白从线粒体内释放而对细胞凋亡发挥作用^[11-13]。学者^[14-15]在人前列腺癌细胞研究发现,塞来昔布能够在内质网水平抑制钙-三磷酸腺苷酶的活性,抑制了从细胞浆再吸收 Ca^{2+} 的作用, Ca^{2+} 浓度在细胞凋亡中具有重要作用,因为它涉及到一系列酶的激活,包括钙感应蛋白酶、核酸内切酶和胱门蛋白酶等。另外,涉及到细胞色素C释放的线粒体渗透转换通道的开放也对 Ca^{2+} 浓度敏感,因此,塞来昔布抑制钙-三磷酸腺苷酶活性的作用,可能是其诱导细胞凋亡的作用机制之一。

综上所述,选择性COX-2抑制剂塞来昔布对人舌鳞癌Tca8113细胞生长增殖具有明显的抑制作用,这种抑制作用与抑制COX-2酶的功能及诱导细胞凋亡有关,但其作用机制有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Botting RM. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane(1927-2004)[J]. J Therm Biol, 2006, 31(1/2): 208-219.
- [2] Hosomi Y, Yokose T, Hirose Y, et al. Increased cyclooxygenase 2(COX-2) expression occurs frequently in precursor lesions of human adenocarcinoma of the lung[J]. Lung Cancer, 2000, 30(2): 73-81.

些中间过程中,细胞的增殖与分化是并存的;而作为具有成骨功能的成熟的成骨细胞,则完全丧失了增殖能力。本研究中机械力刺激诱发的MSCs骨向分化,实际上是处于上述分化过程的初始阶段(具有可逆性),因而,增殖与分化现象并存。

研究表明,单一周期(40 min, 2 000 μE)的机械张力刺激可促进MSCs细胞增殖,提高其ALP的活性,显著上调成骨相关基因TGF- β 和IGF-1的表达;从而诱导MSCs向成骨细胞分化。本研究结果提示,机械力学刺激是MSCs骨向分化的关键驱动因子,对牵张成骨骨痂形成具有重要的作用。

[参考文献]

[1] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418(6893) :41-49.

[2] Qi MC, Hu J, Zou SJ, et al. Mechanical strain induces osteogenic differentiation : Cbfa1 and Ets-1 expression in stretched rat mesenchymal stem cells[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2008, 37(5) : 453-458.

[3] 韩立赤, 胡静, 戚孟春, 等. 大鼠骨髓MSCs体外分离培养及多向分化的实验研究[J]. 口腔医学研究, 2004, 20(2) :142-145.

HAN Li-chi, HU Jing, QI Meng-chun, et al. Isolation and multi-differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. J Oral Sci Res, 2004, 20(2) :142-145.

(上接第 377 页)

[3] Shiotani H, Denda A, Yamamoto K, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinomas and chemopreventive efficacy of a specific inhibitor, nimesulide[J]. Cancer Res, 2001, 61(4) :1451-1456.

[4] van Wijngaarden J, van Beek E, van Rossum G, et al. Celecoxib enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in MDA-MB231 cells by NF- κ B-mediated increase of intracellular doxorubicin accumulation[J]. Eur J Cancer, 2007, 43(2) :433-442.

[5] Nam DH, Park K, Park C, et al. Intracranial inhibition of glioma cell growth by cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib[J]. Oncol Rep, 2004, 11(2) :263-268.

[6] Wun T, McKnight H, Tuscano JM. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) : A potential role in the pathogenesis of lymphoma[J]. Leuk Res, 2004, 28(2) :179-190.

[7] Dandekar DS, Lopez M, Carey RI, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib augments chemotherapeutic drug-induced apoptosis by enhancing activation of caspase-3 and -9 in prostate cancer cells[J]. Int J Cancer, 2005, 115(3) :484-492.

[8] Kern MA, Schubert D, Sahi D, et al. Proapoptotic and antiproliferative potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in human liver tumor cells[J]. Hepatology, 2002, 36(4 Pt 1) :885-894.

[9] Kim SH, Song SH, Kim SG, et al. Celecoxib induces apoptosis in cervical cancer cells independent of cyclooxygenase using

[4] 韩立赤, 胡静, 戚孟春, 等. 密度梯度离心和贴壁法分离大鼠骨髓间充质干细胞增殖活性和成骨功能比较[J]. 现代口腔医学杂志, 2005, 19(3) :287-290.

HAN Li-chi, HU Jing, QI Meng-chun, et al. Comparison of proliferation ability and osteogenic potential of rat bone marrow mesenchymal stem cells isolated by two different methods[J]. J Modern Stomatol, 2005, 19(3) :287-290.

[5] Rubin JP, Bennett JM, Doctor JS, et al. Collagenous microbeads as a scaffold for tissue engineering with adipose-derived stem cells[J]. Plast Reconstr Surg, 2007, 120(2) :414-424.

[6] Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair : IGF, TGF- β and BMP[J]. Bone, 1996, 19(1 Suppl) :1S-12S.

[7] Mehrara BJ, Rowe NM, Steinbrech DS, et al. Rat mandibular distraction osteogenesis. . Molecular analysis of transforming growth factor beta-1 and osteocalcin gene expression[J]. Plast Reconstr Surg, 1999, 103(2) :536-547.

[8] Robey PG, Young MF, Flanders KC, et al. Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta(TGF- β) *in vitro*[J]. J Cell Biol, 1987, 105(1) :457-463.

[9] Farhadieh RD, Dickinson R, Yu Y, et al. The role of transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor , and basic fibroblast growth factor in distraction osteogenesis of the mandible [J]. J Craniofac Surg, 1999, 10(1) :80-86.

[10] Butt RP, Bishop JE. Mechanical load enhances the stimulatory effect of serum growth factors on cardiac fibroblast procollagen synthesis[J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29(4) :1141-1151.

(本文编辑 汤亚玲)

NF- κ B as a possible target[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2004, 130(9) :551-560.

[10] Ruvolo PP. Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites[J]. Pharmacol Res, 2003, 47(5) : 383-392.

[11] Stoica BA, Movsesyan VA, Knoblach SM, et al. Ceramide induces neuronal apoptosis through mitogen-activated protein kinases and causes release of multiple mitochondrial proteins[J]. Mol Cell Neurosci, 2005, 29(3) :355-371.

[12] Gomez Del Pulgar T, Velasco G, Sanchez C, et al. De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis [J]. Biochem J, 2002, 363(Pt 1) :183-188.

[13] Siskind LJ. Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis [J]. J Bioenerg Biomembr, 2005, 37(3) :143-153.

[14] Johnson AJ, Hsu AL, Lin HP, et al. The cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases : A plausible link with its anti-tumour effect and cardiovascular risks[J]. Biochem J, 2002, 366(Pt 3) :831-837.

[15] Wang S, El-Deiry WS. Cytochrome C : A crosslink between the mitochondria and the endoplasmic reticulum in calcium-dependent apoptosis[J]. Cancer Biol Ther, 2004, 3(1) :44-46.

(本文编辑 汤亚玲)