

骨 科 学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002415

基质金属蛋白酶-9 对骨肉瘤增殖、侵袭及迁移能力的影响及其临床意义

胡晓波¹, 李 昕², 周 庚¹

(1. 重庆市中医院骨二科, 重庆 400011; 2. 重庆市中医院皮肤科, 重庆 400021)

【摘要】目的:通过研究骨肉瘤组织中基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)的表达情况,及沉默 MMP-9 后对骨肉瘤细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响,阐明 MMP-9 对骨肉瘤进展的影响及其临床意义。**方法:**通过定量 PCR 分别检测 5 例原发性骨肉瘤及 5 例正常骨组织标本中 MMP 家族的表达情况;通过慢病毒载体介导 shRNA-MMP-9 转染至骨肉瘤细胞 Saos2 中,将实验分为空白对照组(磷酸盐缓冲液, PBS)、阴性对照组(转染 shRNA-NC 序列)及转染组(转染 shRNA-MMP-9 序列),检测 MMP-9 沉默后 Saos2 细胞增殖、侵袭及迁移能力的变化;根据 MMP-9 在患者骨肉瘤标本中的表达水平,对 64 例随访病例分组,进行生存分析。**结果:**筛查 MMP 家族基因,检测发现骨肉瘤组织中 MMP-9 的表达水平明显高于正常骨组织($t=12.040$, $P=0.000$)。骨肉瘤细胞 Saos2 转染 shRNA-MMP-9 后,转染组细胞 MMP-9 mRNA 及蛋白表达水平均明显下降,提示在 Saos2 细胞中成功沉默 MMP-9。在细胞增殖、侵袭及划痕实验中,空白对照组与阴性对照组均无统计学差异,但转染组的细胞相较于阴性对照组,其增殖、侵袭及迁移能力均明显减弱($t=4.954$, $P=0.008$; $t=6.360$, $P=0.003$; $t=3.965$, $P=0.017$)。此外,对 64 例随访病例进行生存分析发现, MMP-9 高表达组患者的总生存率明显低于 MMP-9 低表达组($\chi^2=4.169$, $P=0.041$)。**结论:**骨肉瘤组织中高表达 MMP-9,其与骨肉瘤的增殖、侵袭、转移密切相关,且对骨肉瘤患者的临床预后具有重要提示作用。

【关键词】骨肉瘤;基质金属蛋白酶-9;细胞增殖;侵袭转移**【中图分类号】**R738.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-11-21

Effect of matrix metalloproteinase 9 on the progression of osteosarcoma and its clinical significance

Hu Xiaobo¹, Li Xin², Zhou Geng¹

(1. Department of Orthopaedics and Rehabilitation, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital;

2. Department of Dermatology, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of matrix metalloproteinases 9 (MMP-9) in osteosarcoma tissues and the effect of MMP-9 on the progression of osteosarcoma and its clinical significance. **Methods:** The expression of MMPs' family in 5 osteosarcoma specimens and 5 normal bone tissues was detected by real-time quantitative PCR. shRNA was used to knockdown the expression of MMP-9 in Saos2 cells. The proliferation, invasion and migration of the cells after transfection were detected for the effects of MMP-9 down-regulation. According to the expression of MMP-9 in osteosarcoma, 64 follow-up cases were grouped and analyzed for survival rate. **Results:** Screening of MMPs' family revealed that the expression of MMP-9 in osteosarcoma tissues was significantly higher than that in normal bone tissues ($t=12.040$, $P=0.000$). In cell proliferation, invasion and scratch test, there was no significant difference between blank control group and negative control group. But compared with negative control group, down-regulation of MMP-9 in Saos2 cells markedly repressed cell proliferation, decreased invasion and migration ($t=4.954$, $P=0.008$; $t=6.360$, $P=0.003$; $t=3.965$, $P=0.017$). In addition, a survival analysis in 64 follow-up cases showed that the overall survival rate of the high-MMP-9 group was significantly lower than that of the low-MMP-9 group ($\chi^2=4.169$, $P=0.041$). **Conclusion:** The high expression of MMP-9 in osteosarcoma

tissue is closely related to the proliferation, invasion and migration of osteosarcoma, which has certain implication for the clinical prognosis of patients.

【Key words】osteosarcoma; matrix metalloproteinase 9; cell proliferation; invasion and migration

作者介绍: 胡晓波, Email: huxiaobo9999@163.com,

研究方向: 骨肿瘤。

通信作者: 周 庚, Email: uglybrother520@163.com。

基金项目: 重庆市卫计委中医药科技资助项目(编号: ZY201703012)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200325.1536.004.html>

(2020-03-26)

骨肉瘤是儿童、青少年中最常见的恶性肿瘤之一,多发于长骨干骺端,表现为成骨细胞分化,并产生未成熟的骨或类骨组织^[1]。由于其较高的复发率及肺部转移率,骨肉瘤也是青少年癌症死亡的主要原因之一^[2]。骨肉瘤的进展与危险因素如年龄、性别及家族遗传等密切相关,但其确切病因尚不明确,参与骨肉瘤进展的分子调控机制也有待进一步阐明^[3]。目前,根治性手术切除联合多药化疗方案是骨肉瘤的主要治疗手段,但此治疗方案面临耐药性、复发及转移等复杂问题^[4]。因此,有必要进一步深入研究骨肉瘤发生发展的分子调控机制,寻找骨肉瘤潜在的治疗靶点,以改善患者预后。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一种蛋白水解酶,在细胞外基质(extracellular matrix, ECM)重构中起重要作用,同时影响细胞的生长、分化、凋亡、迁移、侵袭及血管生成^[5]。研究发现 MMPs 的升高与骨肉瘤的转移和不良预后密切相关。MMP-9 作为基质金属蛋白酶家族的重要组成成分,主要功能是降解 ECM 中的Ⅳ型胶原和明胶,影响肿瘤的浸润转移能力。前期研究发现 MMP-9 在骨肉瘤组织标本中高表达,但其对骨肉瘤发生发展的作用机制尚不明确^[6]。本文将通过沉默 MMP-9 在骨肉瘤细胞 Saos2 中的表达,研究 MMP-9 对 Saos2 细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响,阐明 MMP-9 在骨肉瘤发生发展中的作用;并通过检测原发性骨肉瘤临床标本中 MMP-9 的表达,探讨其表达水平与患者临床预后的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床资料 收集重庆市中医院(道门口院区)2015 年 2 月至 2018 年 8 月间,手术切除的原发性骨肉瘤标本 78 例,其中男性 45 例,女性 33 例;年龄 7~58 岁,平均(22.77 ± 11.19)岁;根据组织类型分为骨母细胞型 31 例,软骨母细胞型 12 例,纤维母细胞型 19 例,血管扩张型 6 例及混合型 10 例;根据 Enneking 外科分期分为Ⅰ期 7 例,Ⅱa 期 26 例,Ⅱb 期 37 例,Ⅲ期 8 例。对以上病例进行随访,回访 64 例。另外,在知情同意的情况下,取正常骨组织标本 5 例。

1.1.2 细胞及实验试剂 人骨肉瘤细胞系 Saos2 来自美国菌种保存中心(ATCC);细胞培养基 PRMI1640 及胎牛血清购自 Gibco 公司;Trizol、PrimeScript RT reagent kit 购自 Takara 公司;SYBR Green qPCR Master Mix 购自 Toyobo 公司;RIPA 裂解液、蛋白 Marker、ECL 显色液购自 Thermo 公司;蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司;MMP-9 兔抗人多克隆抗体、GAPDH

兔抗人单克隆抗体购自 Abcam 公司;HRP 标记的山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥;慢病毒载体购自汉恒生物,其中转染组 shRNA-MMP-9 序列为 5'-UCCAGGGCGAGGACCA-UAGAG-3',阴性对照组 shRNA-NC 序列为 5'-ACGUGAC-ACGUUCGGAGAAGTCT-3';Cell Counting Kit 8 (CCK-8)购自 DOJINDO 公司;Cell Invasion Assay Kit 购自 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 用含 10%FBS、1%青链霉素的 RPMI1640 培养基,在 37 ℃、5%CO₂ 孵箱中培养骨肉瘤细胞 Saos2,当细胞在培养瓶中长至 80%左右时可进行消化传代。将处于生长期的 Saos2 细胞用胰酶消化后,调整细胞浓度 5 × 10⁵ 个/mL 接种于 12 孔板中,1 mL/孔,根据细胞的不同处理实验分组为空白对照组(磷酸盐缓冲液, PBS)、阴性对照组(转染 shRNA-NC 序列)及转染组(转染 shRNA-MMP-9 序列)。具体转染步骤参见汉恒生物慢病毒转染说明书,转染 48 h 后通过 Real-time PCR 及 Western blot 检测转染效果。

1.2.2 Real-time PCR 检测组织样本中 MMP 家族及 Saos2 细胞中 MMP-9 表达水平 根据说明书用 Trizol 一步法提取骨肉瘤组织(Ⅱb 期)、正常骨组织标本(各 5 例)及 Saos2 细胞的总 RNA,检测其浓度、纯度符合要求后,用 Takara 试剂盒将 RNA 逆转录合成 cDNA,再用 Toyobo 的 SYBR Green 试剂盒进行定量 PCR 扩增,其中 MMP-9 的引物序列上游为:5'-GCGTCTTCCCTTCACTTT-3',下游为 5'-AAGCCCCACTT-CTTGTCG-3';GAPDH 的引物序列上游为:5'-GGGGCTCT-CCAGAACATC-3',下游为 5'-TGACACGTTGGCAGTGG-3'。扩增反应条件:95 ℃,预变性 10 min;95 ℃变性,30 s,58 ℃退火 10 s,72 ℃延伸 30 s;40 个循环。

1.2.3 Western blot 检测 MMP-9 表达情况 将转染 48 h 的 Saos2 细胞用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液在冰上裂解细胞 30 min,然后 4 ℃,12 000 r/min 离心 5 min,收集上清总蛋白,加入适量蛋白上样缓冲液(5 ×),在 100 ℃金属浴上加热 10 min,使蛋白变性;每组加样本 30 μg/泳道,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE);200 mA 电转 120 min,使凝胶中的蛋白转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜;封闭后,根据目的蛋白大小,将膜剪开分别孵育 MMP-9 兔抗人多克隆抗体(1:1 000)、GAPDH 兔抗人单克隆抗体(1:2 000),4 ℃过夜;PBST 洗膜 3 次,10 min/次;在室温下,用 1:10 000 HRP 标记的山羊抗兔二抗孵育 PVDF 膜 60 min;再用 PBST 洗膜 3 次,10 min/次;用 ECL 显色,在 Bio-Rad 成像仪下显影。

1.2.4 CCK-8 检测细胞增殖能力 将不同处理组的 Saos2 细胞消化后,调整细胞浓度至 5 × 10⁴ 个/mL,分别接种于 3 个 96 孔平底板中,100 μL/孔,每组设置 3 个复孔,放入孵箱培养过夜;检测时加入 10 μL/孔 CCK-8 试剂,37 ℃孵育 120 min,用酶标仪在 450 nm 处测其光密度(optical density, OD)值,分别在细胞培养 24、48、72 h 检测。

1.2.5 细胞侵袭能力检测 将不同处理组的 Saos2 细胞消化离心后,用无血清的 RPMI1640 培养基重悬细胞,调整细胞浓度至 5 × 10⁵ 个/mL;从 Cell Invasion Assay Kit 中取出侵袭小室置于 24 孔板中;上室加入 Saos2 细胞 100 μL(即 5 ×

10^4 个/孔), 下室加入 600 μ L 含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基; 放入孵箱培养 24 h 后取出, 用棉棒擦去小室上层未穿过膜的细胞, 再用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, PBS 洗涤 3 遍、5 min/次, 小室风干后用结晶紫染液染色 15 min, 再用 PBS 洗涤 3 遍、5 min/次, 风干后显微镜下随机视野采图并计数穿膜细胞数

1.2.6 划痕实验检测细胞迁移能力 用 Marker 笔在 6 孔板背面平行划线, 以作为后续采图时的标记; 分别将不同处理的 Saos2 细胞消化离心后, 调整细胞浓度至 5×10^5 个/mL、2 mL/孔, 加入 6 孔板中; 当细胞融合率达 100% 时, 用 10 μ L 枪头做划痕, 且划痕垂直于 Marker 笔做的标记; 用 PBS 冲洗 3 遍, 将漂浮的细胞洗去, 再加入无血清 RPMI1640 培养基 2 mL/孔, 分别在 0、24 h, 拍照记录细胞划痕愈合距离。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组均数间比较采用独立样本 t 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。随访资料生存分析用 Kaplan-Meier 法分析及 log-rank 检验。

2 结果

2.1 MMP 家族在骨肉瘤及正常骨组织中的表达水平

提取正常骨组织及骨肉瘤组织标本 (各 5 例) 中 RNA, 通过逆转录、Real-time PCR 筛查 MMP 家族基因表达情况, 结果显示骨肉瘤组织中 MMP-9 mRNA 水平 (10.193 ± 1.196) 相较于正常骨组织中 MMP-9 mRNA 水平 (2.038 ± 0.636) 明显增高, 差异具有统计学意义 ($t=12.040, P=0.000$) (图 1)。

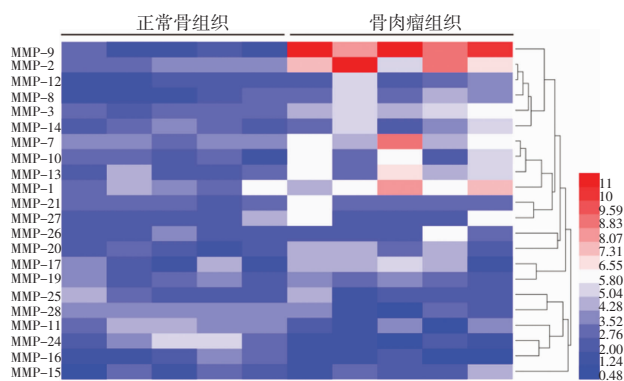


图 1 正常骨组织及骨肉瘤组织中 MMP 家族 mRNA 的表达水平

2.2 沉默 Saos2 细胞中 MMP-9 基因的表达及鉴定

通过慢病毒转染 shRNA-MMP-9 及 shRNA-NC 序列至骨肉瘤细胞 Saos2 中, Real-time PCR 定量检测 MMP-9 的表达。结果显示空白对照组 (Saos2 组) 与阴性对照组 (shRNA-NC 组) 相比较, MMP-9 mRNA 的表达无统计学差异; 而转染组 (shRNA-MMP-9 组) 相较于阴性对照组, MMP-9 mRNA 水平明显下调 ($t=7.353, P=0.002$)。另外, 与 mRNA 的结果一致, Western blot 检测发现转染组中 MMP-9 的蛋白水平较对照

组也明显下调 (图 2)。以上结果表明, shRNA-MMP-9 沉默效果显著, 可用于后续实验。

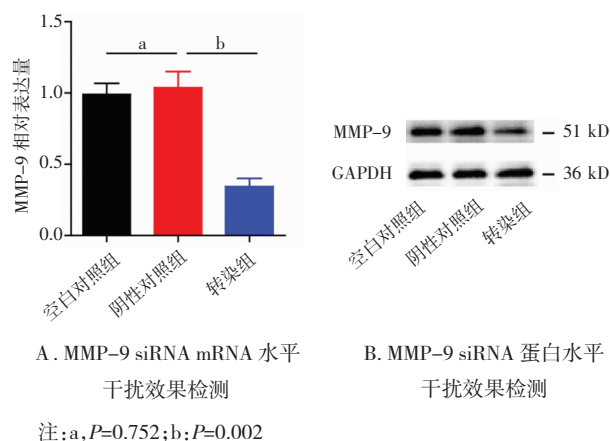


图 2 Saos2 细胞在不同处理组中 MMP-9 mRNA 及蛋白表达水平

2.3 沉默 MMP-9 对骨肉瘤细胞 Saos2 增殖能力的影响

CCK-8 检测不同处理组中细胞增殖能力, 结果显示空白对照组与阴性对照组的细胞增殖能力无统计学差异; 在细胞增殖 48 h 后: 相较于阴性对照组, 转染组细胞的增殖能力受到抑制 ($t=4.024, P=0.016$); 在细胞增殖 72 h 后: 转染组细胞的增殖能力较阴性对照组明显下降 ($t=4.954, P=0.008$), 具体如图 3 所示。结果表明沉默 MMP-9 表达后, 骨肉瘤细胞 Saos2 的增殖能力受到显著抑制。

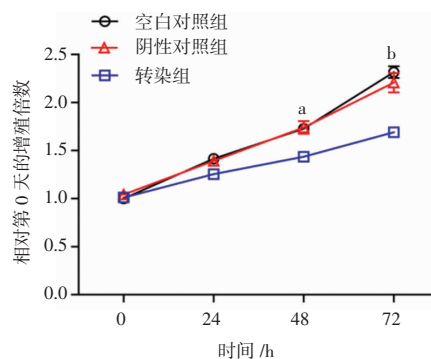


图 3 CCK-8 检测不同处理组中细胞增殖能力

2.4 沉默 MMP-9 对骨肉瘤细胞 Saos2 侵袭能力的影响

通过 Transwell 侵袭实验检测发现, 在显微镜 200 倍视野下, 空白对照组与阴性对照组中穿膜细胞数分别为 (209.73 ± 13.92)、(193.33 ± 14.01) 个/视野, 2 组中细胞的侵袭能力无统计学差异 ($t=0.956, P=0.393$); 但是, 转染组穿膜细胞数为 (111.33 ± 11.67) 个/视野, 显著低于阴性对照组 ($t=6.360, P=0.003$) (图 4)。结果表明沉默 MMP-9 将抑制骨肉瘤细胞 Saos2 的侵袭能力。

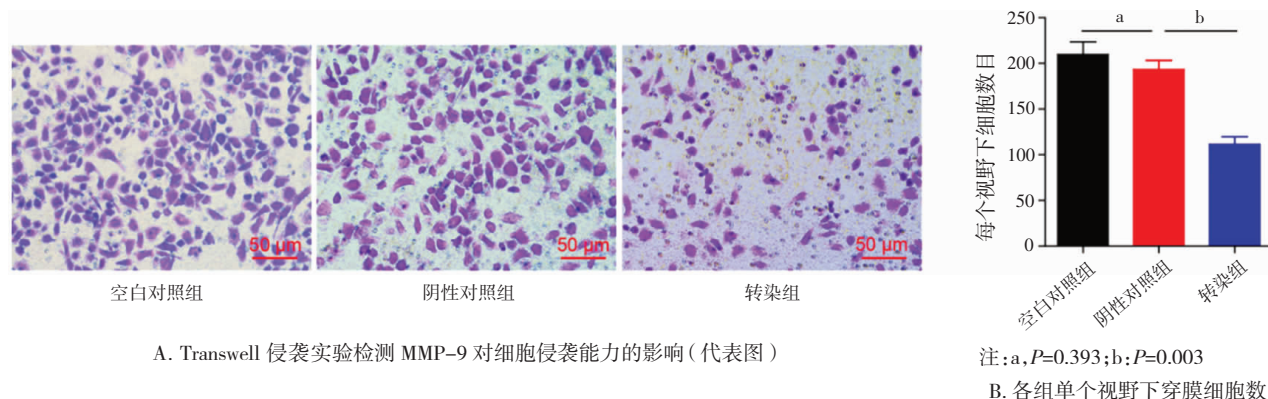


图 4 沉默 MMP-9 表达对骨肉瘤 Saos2 细胞侵袭能力的影响

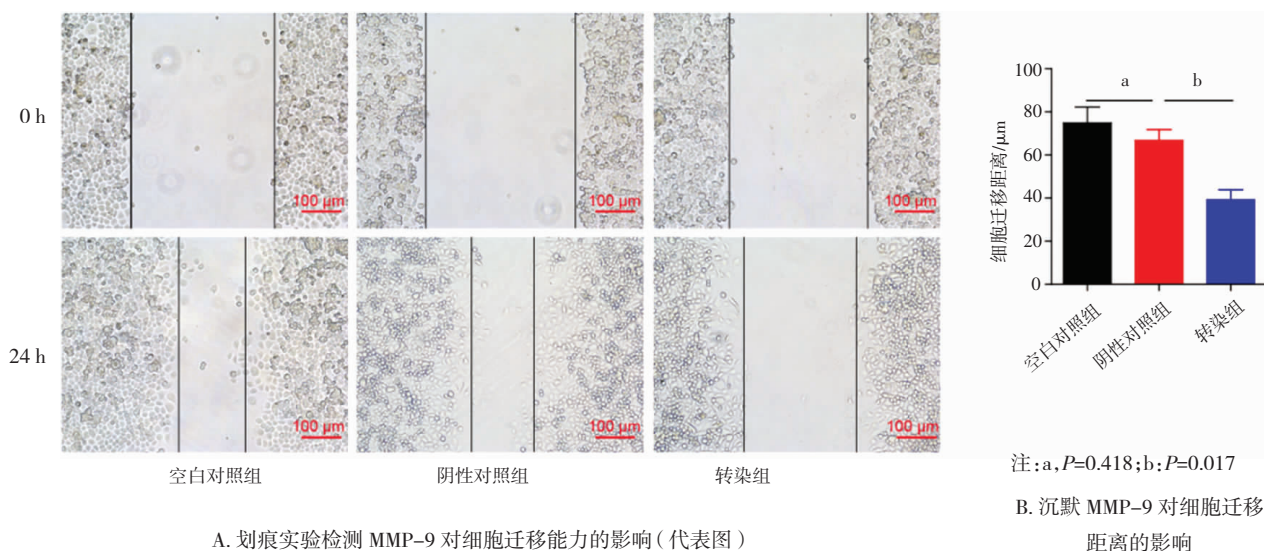


图 5 沉默 MMP-9 表达对骨肉瘤 Saos2 细胞迁移能力的影响

2.5 沉默 MMP-9 对骨肉瘤细胞 Saos2 迁移能力的影响

通过划痕实验在显微镜 100 倍视野下采图,检测发现空白对照组与阴性对照组中细胞迁移距离分别为 (74.8 ± 10.5) 、 $(66.7 \pm 7.2) \mu\text{m}$, 2 组细胞的迁移能力无统计学差异 ($t=0.902$, $P=0.418$); 而转染组细胞 24 h 迁移距离为 $(39.2 \pm 6.7) \mu\text{m}$, 显著小于阴性对照组 ($t=3.965$, $P=0.017$) (图 5)。这一结果表明沉默 MMP-9 将使 Saos2 细胞的迁移能力下调。

2.6 原发性骨肉瘤中 MMP-9 的表达水平与患者生存率的关系

Real-time PCR 检测手术切除的骨肉瘤标本中 MMP-9 的表达水平,根据骨肉瘤组织中 MMP-9 mRNA 的中位数 (8.143),将患者分为 MMP-9 高表达及低表达组进行生存分析,发现 MMP-9 高表达组患者的总生存率显著低于 MMP-9 低表达组 ($\chi^2=4.169$, $P=0.041$),提示骨肉瘤中 MMP-9 的表达水平与患者预后呈负相关 (图 6)。

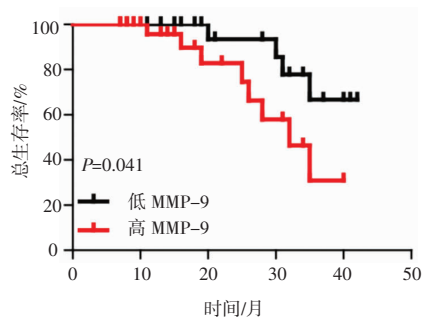


图 6 MMP-9 高低两组患者的总生存率差异分析

3 讨论

MMP-9 是 MMP 家族重要成员之一,定位于染色体 20q12~q13,其主要作用底物为细胞外基质 IV

型胶原酶、明胶及纤维连接蛋白,其在肿瘤侵袭转移及组织修复中的作用日益受到重视。本研究基于临床组织标本,通过筛查 MMP 家族表达情况,发现 MMP-9 在原发性骨肉瘤组织中高表达。在体外,通过慢病毒转染沉默骨肉瘤细胞 Saos2 中 MMP-9 的表达,骨肉瘤细胞的增殖、侵袭和迁移能力均受到显著抑制,提示 MMP-9 在骨肉瘤发生发展中发挥了重要作用。最后,对入组的病例进行临床随访,发现在术后一年内 MMP-9 表达的高低与患者生存率无统计学差异,但随着随访时间延长,MMP-9 高表达患者组生存率明显降低,提示 MMP-9 的检测对判断骨肉瘤患者的预后具有一定的参考意义。

MMP-9 也称为明胶酶 B,通常与骨重建相关。近年研究发现,在骨肉瘤中有 MMP-9 蛋白及 mRNA 的过度表达,其与骨肉瘤的发生发展密切相关。MMP-9 的过表达已被认为是肿瘤侵袭转移的重要因素之一^[7]。近期,有 meta 分析显示,MMP-9 的表达水平与骨肉瘤患者预后密切相关^[6]。在骨肉瘤转移患者中发现,MMP-9 的过表达是肿瘤转移发生的重要原因之一。当 MMP-9 活性受限时,肿瘤转移受到抑制;而活性增高时,肿瘤转移潜能增强^[8]。

骨肉瘤作为一种极具侵袭性的原发性骨恶性肿瘤,尽管已有联合治疗方案,但由于其复发、转移及耐药的发生率较高,目前的治疗效果并不理想。近年,在骨肉瘤的治疗中,靶向于 MMP 家族日益受到重视。乌果昔是一种黄芩根的提取物,可通过下调 MMP-9 进而抑制骨肉瘤细胞的侵袭和转移^[9]。另外,在体外研究发现,小分子 miR-34c-5p 可通过靶向 FLOT2-MMP-9 轴,进而抑制骨髓瘤细胞的增殖、侵袭和转移^[9]。此外,有研究发现松弛素 2 可通过 S100A4/MMP-9 通路影响骨肉瘤细胞的迁移、侵袭和增殖;当通过 siRNA 方法沉默松弛素 2 的表达后,S100A4 和 MMP-9 的合成受到抑制,骨肉瘤的侵袭能力和细胞活力均减弱^[10]。在骨肉瘤细胞中通过慢病毒转染生长抑制因子 4 后,细胞周期发生改变,其 S 期细胞减少,G₀~G₁ 期终止,细胞的增殖受到显著抑制;同时,由于骨肉瘤细胞转染了生长抑制因子 4,MMP-9 及 MMP-2 的表达下调,细胞的侵袭能力也减弱^[11]。另外,有研究显示:在骨肉瘤组织中,环氧化酶-2(COX-2)常呈现较高的表达水平,它可通过促进前列腺素的大量分泌介导肿瘤的进展。研究发现 COX-2 的抑制剂塞来昔布可通过靶向抑制 MMP-9 的表达,抑制骨肉瘤细胞的增殖并促进其凋亡^[12]。

目前,骨肉瘤仍是一种威胁生命的疾病,其分

子调控机制尚不清楚。近年的研究发现,骨肉瘤中的基质金属蛋白酶常常上调表达,并在肿瘤的发生和转移中发挥重要作用。因此,基质金属蛋白酶可成为骨肉瘤治疗的潜在靶点,通过使用高选择性的基质金属蛋白酶抑制剂,可将骨肉瘤治疗中的副作用显著降低,具有良好的应用前景。当然,选择性的基质金属蛋白酶抑制剂在骨肉瘤治疗中的作用及其毒性还需要开展更多的临床实验进行评估。

参 考 文 献

- [1] Tang H,Tang Z,Jiang Y,et al. Pathological and therapeutic aspects of matrix metalloproteinases;implications in osteosarcoma[J]. Asia Pac J Clin Oncol,2019,15(4):218-224.
- [2] Wang L,Liu W,Tang H,et al. DRP5 is involved in cancer cell growth and predicts poor prognosis in human osteosarcoma[J]. Cancer Med,2017,6(5):982-993.
- [3] Calvert GT,Randall RL,Jones KB,et al. At-risk populations for osteosarcoma;the syndromes and beyond[J]. Sarcoma,2012,2012:152382.
- [4] Guo Y,Chen YH,Cheng ZH,et al. Tectorigenin inhibits osteosarcoma cell migration through downregulation of matrix metalloproteinases *in vitro*[J]. Anticancer Drugs,2016,27(6):540-546.
- [5] Huynh DL,Kwon T,Zhang JJ,et al. Wogonin suppresses stem cell-like traits of CD133 positive osteosarcoma cell via inhibiting matrix metalloproteinase-9 expression[J]. BMC Complement Altern Med,2017,17(1):304.
- [6] Liu Y,Wang Y,Teng Z,et al. Matrix metalloproteinase 9 expression and survival of patients with osteosarcoma;a meta-analysis[J]. Eur J Cancer Care,2017,26(1):12364.
- [7] Van den Steen P,Dubois B,Nelissen I,et al. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9(MMP-9)[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol,2002,37(6):375-536.
- [8] Ma JF,Liu L,Yang WJ,et al. RNAi-mediated knockdown of relaxin decreases *in vitro* proliferation and invasiveness of osteosarcoma MG-63 cells by inhibition of MMP-9[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2013,17(8):1102-1109.
- [9] Wang Y,Wang X,Tang J,et al. The study of mechanism of miR-34c-5p targeting FLOT2 to regulate proliferation,migration and invasion of osteosarcoma cells[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol,2019,47(1):3559-3568.
- [10] Ren XF,Zhao H,Gong XC,et al. RLN2 regulates *in vitro* invasion and viability of osteosarcoma MG-63 cells via S100A4/MMP-9 signal[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2015,19(6):1030-1036.
- [11] Li M,Zhu Y,Zhang H,et al. Delivery of inhibitor of growth 4 (ING4) gene significantly inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis of human osteosarcoma cells[J]. Sci Rep,2014,4:7380.
- [12] Zhou X,Shi X,Ren K,et al. Celecoxib inhibits cell growth and modulates the expression of matrix metalloproteinases in human osteosarcoma MG-63 cell line[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2015,19(21):4087-4097.

(责任编辑:张辉洁)