

· 基础研究 ·

巨噬细胞清道夫受体1通过JAK/STAT3信号通路调节骨髓间充质干细胞成骨分化

殷旻皓¹, 刘浩², 张永杰^{1*}

¹南京医科大学人体解剖学系, 江苏 南京 211166; ²南京医科大学第一附属医院骨科, 江苏 南京 210029

[摘要] **目的:**探索巨噬细胞清道夫受体1(macrophage scavenger receptor 1, MSR1)对骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)成骨分化的调控作用及机制。**方法:**在体内水平,对MSR1野生型(wild type, WT)及敲除(knock out, KO)小鼠进行胫骨骨皮质缺损模型,并于术后第10天对缺损部位进行小动物CT扫描三维重建及参数分析。在体外实验中,用MSR1 WT及KO小鼠来源的原代巨噬细胞的条件培养基刺激BMSC,并通过CCK-8、Transwell、茜素红染色、碱性磷酸酶染色和实时定量逆转录聚合酶链反应等实验检测MSR1对BMSC的增殖、迁移和成骨分化能力的调控作用。最后,通过Western blot和ELISA实验探讨MSR1对BMSC成骨分化发挥调控作用的具体机制。**结果:**在体内水平,MSR1的缺失可导致小鼠骨愈合能力显著减弱。在体外水平,MSR1的敲除可显著影响BMSC的成骨分化能力,但不影响增殖及迁移能力。在机制探索方面,MSR1可通过JAK/STAT3信号通路上调骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)的分泌,进而发挥其对BMSC成骨分化的调控作用。**结论:**MSR1是巨噬细胞发挥调节BMSC成骨分化作用的关键分子之一,这为今后靶向MSR1促进骨愈合提供了坚实的理论基础。

[关键词] 巨噬细胞清道夫受体1;骨髓间充质干细胞;成骨分化;JAK/STAT3信号通路

[中图分类号] Q254

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)08-1105-06

doi:10.7655/NYDXBNS20200805

Macrophage scavenger receptor 1 regulates BMSC osteogenic differentiation through JAK/STAT3 signaling pathway

YIN Minhao¹, LIU Hao², ZHANG Yongjie^{1*}

¹Department of Human Anatomy, Nanjing Medical University, Nanjing 211116; ²Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of macrophage scavenger receptor 1 (MSR1) on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods:** *In vivo*, MSR1 wild type (WT) and knock out (KO) mice were used to perform tibial monocortical defect model. Further, the three-dimensional reconstruction and parameter analysis after micro-CT scan were carried out on day 10 post-injury. *In vitro*, BMSCs were first stimulated by conditioned medium from MSR1 WT or KO primary macrophages. Then, CCK-8, Transwell, alizarin red staining, alkaline phosphatase staining and real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction were performed to explore the effect of MSR1 on proliferation, migration and osteogenic differentiation of BMSCs. Western blot and ELISA were used to investigate the specific mechanism of MSR1 on osteogenic differentiation of BMSCs. **Results:** The loss of MSR1 significantly reduced the ability of bone regeneration *in vivo*. In addition, knockout of MSR1 in macrophages significantly affected the osteogenic differentiation ability of BMSCs, but not the proliferation and migration ability *in vitro*. We also identified MSR1 could increase the secretion of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) through JAK/STAT3 signaling pathway, thus exerting its regulatory effect on BMSCs osteogenic differentiation. **Conclusion:** MSR1 is one of the key molecules that macrophages play a role in regulating osteogenic differentiation of BMSCs, which provides a solid theoretical basis for

[基金项目] 国家自然科学基金(81472081); 国家自然科学基金青年基金(81100942); 江苏省自然科学基金(BK2010539); 2020年江苏省青蓝工程资助

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhangyongjie@njmu.edu.cn

targeting macrophages MSR1 to promote bone healing in the future.

[Key words] macrophage scavenger receptor 1; bone marrow mesenchymal stem cell; osteogenic differentiation; JAK/STAT3 signaling pathway

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(08): 1105-1110]

骨折延迟愈合或不愈合是骨折患者的严重并发症,约占10%^[1]。中国作为世界第一人口大国,随着交通运输业的迅猛发展,骨折不愈合患者的数量及其因治疗带来的社会经济负担不容忽视。骨折的愈合是一个复杂而又有序的过程,主要包括两种类型:膜内成骨和软骨内成骨^[2-3]。间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cell, MSC)直接分化为成骨细胞,形成骨样组织并逐渐骨化成新骨的过程即为膜内成骨^[2-3]。在软骨内成骨的过程中, MSC首先分化为软骨细胞,随后软骨细胞增生、成熟肥大、凋亡,在软骨细胞成熟肥大的同时伴有血管长入, MSC重新成骨,并逐步替代软骨,在破骨细胞的作用下发生骨重建^[2-3]。近年来,越来越多的研究聚焦于巨噬细胞在骨折愈合过程中所扮演的角色。既往研究表明,去除巨噬细胞后,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)向成骨细胞的分化受到显著抑制,表现为骨痂形成障碍、骨再生能力减弱^[4]。体外研究进一步发现,巨噬细胞可通过分泌多种细胞因子调节BMSC的增殖、迁移和成骨分化能力^[4]。但巨噬细胞调控BMSC骨再生能力的关键分子和具体机制尚不清楚。

巨噬细胞清道夫受体1(macrophage scavenger receptor 1, MSR1)是一种主要表达在巨噬细胞膜上的蛋白,具有广泛和重要的生理功能,参与巨噬细胞的黏附、内吞和细胞因子分泌等功能^[5]。此外还有研究报道, MSR1在肿瘤、动脉粥样硬化、缺血再灌注损伤等疾病的病理生理过程中也起到十分重要的作用^[5]。然而其对于骨再生的调节作用尚不清楚。

骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)是转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF β)超家族中的一员^[6]。作为一种分泌蛋白, BMP2可通过与细胞表面的相应受体结合,进而发挥促进MSC向成骨分化和促进成骨细胞矿化等作用。既往研究显示, Janus蛋白激酶(Janus kinase, JAK)/信号转导和转录激活因子3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)信号通路可调控巨噬细胞的极化状态,促进其向M2型极化,并分泌多种抗炎因子和细胞生长因子^[7]。近期研究

报道, JAK/STAT3信号通路的激活可导致BMP2的表达升高^[8]。MSR1是否通过JAK/STAT3信号通路调控BMP2的分泌尚不清楚。

因此,本研究旨在利用MSR1基因敲除小鼠,探索MSR1对BMSC成骨分化的影响及机制,为今后骨折不愈合或延迟愈合的治疗提供全新策略和有效靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

选取8~12周龄的MSR1基因敲除鼠(knock out, KO),野生型(wild type, WT)小鼠作为对照(具有相同性别、周龄的C57BL/6小鼠),在小鼠4周龄时提取原代巨噬细胞。上述小鼠均由南京医科大学实验动物中心饲养,所有饲养流程和实验操作均符合要求,且经由南京医科大学动物保护委员会批准。

巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, MCSF)(R&D公司,美国),胎牛血清、双抗(青霉素与链霉素)(Gibco公司,美国),小鼠BMSC培养基、小鼠骨髓间充质细胞成骨诱导培养基、茜素红染料、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染料(广州赛业生物科技),胰酶、ALP检测试剂盒(上海碧云天),BMP2 ELISA试剂盒(武汉华美生物),Transwell小室(Corning公司,美国),RNAiso plus(D9108A)TRIzol, cDNA逆转录试剂盒(大连宝生物),Power SYBR Green PCR Master Mix(Invitrogen公司,美国),ECL发光液(Thermo公司,美国),RPMI1640培养基、1×PBS(北京索莱宝),CCK-8试剂盒(同仁公司,日本),0.1%结晶紫染料(武汉塞维尔生物科技),Ruxolitinib(Selleck公司,美国), β -actin(天津百倍生物科技),MSR1、BMP2(Abcam公司,美国),STAT3、p-STAT3(CST公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠胫骨骨皮质缺损模型及小动物CT扫描

待MSR1 WT和KO小鼠($n=3$)充分麻醉后,用执笔式磨钻垂直于骨面,在生理盐水的缓慢冲洗下,制备直径为0.8 mm、深度为0.3~0.4 mm的胫骨骨皮质缺损。术毕,生理盐水冲洗伤口,逐层缝合

软组织与皮肤后重新放入鼠笼,密切关注小鼠伤口及全身情况,按实验设计的时间点进行收模。将不同组小鼠胫骨进行小动物CT(LCT-200, Hitachi公司,日本)扫描并分析,相关参数包括骨痈体积/组织体积(bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨小梁数量(trabecular number, TbN)、骨小梁厚度(trabecular thickness, TbTh)和骨小梁分离度(trabecular separation, TbSp)。数据分析采用LaTheta软件,三维重建图像采用3D图像分析软件(TRI/3D-BONE)。

1.2.2 小鼠骨髓来源巨噬细胞的提取及诱导分化

首先分离4周龄MSR1 WT和KO小鼠的股骨与胫骨(尽量剔除肌肉等软组织)于PBS中,并置于冰上;将含有股骨与胫骨的培养皿移至超净台内,经过酒精短暂浸泡后,置于含有新的无菌PBS的培养皿内;随后剪去股骨或胫骨的两端,用含有空培的注射器冲髓腔;内容物经过200目滤网过滤后收集于离心管内;1 000 g离心10 min后,弃上清,加入红细胞裂解液并吹打混匀,1 000 g离心5 min;加入PBS重悬以去除剩余红裂液,再次1 000 g离心5 min;最后用含有20 ng/mL MCSF的RPMI1640完全培养基重悬,按实验需求进行铺板。每2~3 d换液1次,诱导分化7 d,巨噬细胞可成熟。

1.2.3 BMSC的提取

提取步骤同1.2.2,最后改用小鼠BMSC培养基进行重悬,每3 d换液1次。

1.2.4 CCK-8实验

预先在96孔板每孔中接种3 000个待测BMSC(100 μ L/孔),分为MSR1 WT和KO小鼠巨噬细胞条件培养基刺激组($n=3$)。每孔中加入10 μ L CCK-8试剂后,放入孵箱继续培养1 h,酶标仪测定450 nm处的吸光度值作为0点。每天同一时间点进行加样和检测吸光度值,连续检测96 h,绘制生长曲线。

1.2.5 Transwell实验

将BMSC消化、计数后,调整细胞密度至 2×10^4 个/mL,上室加100 μ L细胞悬液,下室加700 μ L MSR1 WT或KO小鼠巨噬细胞来源的条件培养基($n=3$)。操作完成后,置于孵育箱培养24 h后,吸弃上室培养基,用PBS浸洗小室底膜2次,用棉签擦尽小室内膜的细胞后,使用4%多聚甲醛固定30 min。固定完成后,用PBS浸洗外膜1~2次,用0.1%结晶紫进行染色15 min。随后,吸弃结晶紫,予PBS洗涤后,通过显微镜进行观察和拍摄。

1.2.6 成骨诱导分化

首先进行成骨诱导培养基的配制,同时提前对

使用的培养皿底面进行明胶包被,以防止诱导成骨分化过程中BMSC发生漂浮。将融合度已达80%~90%的BMSC消化、计数后,以 2×10^4 个/ cm^2 的密度进行种板,当细胞长至60%时,吸弃原有培养基,加入已预热至37 $^{\circ}\text{C}$ 的小鼠骨髓间充质细胞成骨诱导培养基与MSR1 WT组和KO组小鼠巨噬细胞条件培养基($n=3$),按1:1混合后刺激BMSC。每3 d换液1次,诱导14 d。

1.2.7 茜素红染色

吸弃原有培养基后用PBS轻柔清洗1~2次;通过4%多聚甲醛固定30 min后加入茜素红染料,染色15~20 min;随后,吸弃茜素红,予PBS洗涤后通过显微镜进行观察和拍摄。此外,使用氯化十六烷吡啶处理后,可通过分光光度计,检测562 nm处的吸光度值进行定量分析。

1.2.8 ALP染色及检测

吸弃原有培养基后用PBS轻柔清洗3次;通过4%多聚甲醛固定30 min后,加入ALP染料染色30 min;随后,吸弃染料,予PBS洗涤2遍后通过显微镜进行观察和拍摄。此外,加入裂解液后,按试剂盒说明书进行操作,于405 nm波长处测定吸光度值。

1.2.9 实时定量逆转录聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)

按照说明书,使用TRIzol试剂提取细胞的总RNA,随后通过逆转录试剂盒,逆转录为cDNA后,进行qRT-PCR检测。相应的引物序列为:I型胶原(collagen type I, Col I):上游5'-CTGGCGTTCAG-GTCCAAT-3',下游5'-TTCCAGGCAATCCACGAGC-3';ALP:上游5'-CCAACTCTTTTGTGCCAGAGA-3',下游5'-GGCTACATTGGTGTGAGCTTTT-3';骨钙素(osteocalcin, Ocn):上游5'-ATGAGCCCTCAG-ACTCCTC-3',下游5'-CGGCCGTAGAGCGCCGATA-3';Runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2, Runx2):上游5'-AGAGTCAGATTACAGAT-CCCAGG-3',下游5'-TGGCTCTTCTTACTGAGAGA-GG-3'。

1.2.10 ELISA实验

收集MSR1 WT和KO组小鼠巨噬细胞上清后($n=3$),每孔加入100 μ L标准品或待测样品,按照试剂盒说明书,检测450 nm处的吸光度。

1.2.11 Western blot实验

使用IP裂解液提取细胞总蛋白后,吸取一部分进行BCA蛋白定量。随后将蛋白样品进行SDS-PAGE电泳、转膜后,用5%脱脂奶粉溶液或5% BSA

在摇床上进行封闭2 h。封闭结束后,将膜用TBST洗3遍;在4℃条件下,孵育相应一抗,过夜。次日,用PBST洗3遍,室温孵育二抗1 h;TBST洗3遍,加入化学发光液,上机进行成像。

1.3 统计学方法

采用SPSS19.0统计软件及GraphPad Prism 7.0软件分析和处理数据。实验中所有定量数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用未配对双尾 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

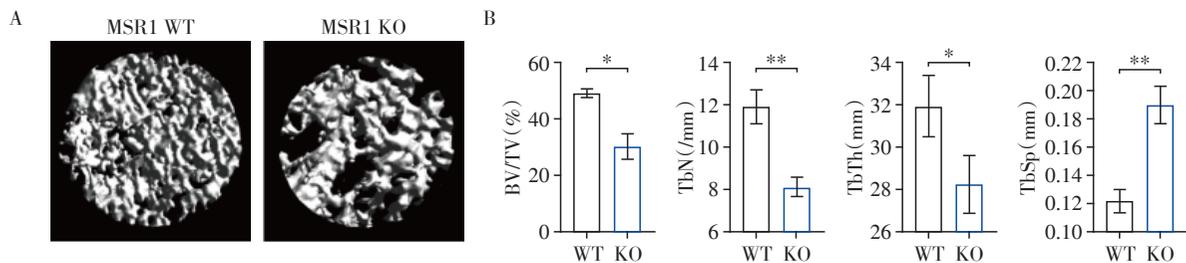
2.1 MSR1敲除小鼠的膜内成骨能力显著弱于对照小鼠

为探索MSR1对骨再生的影响,首先对MSR1 WT和KO小鼠进行胫骨骨皮质缺损造模,并于术后

第10天收模,通过小动物CT进行三维重建与相关参数分析。如图1A所示,与MSR1 WT小鼠相比,MSR1 KO小鼠的膜内成骨能力显著减弱。进一步的参数分析结果显示,与MSR1 WT小鼠相比,MSR1 KO小鼠的BV/TV、TbN和TbTh均显著下降;而TbSp显著升高(图1B)。上述结果提示,MSR1 KO小鼠与MSR1 WT小鼠相比膜内成骨能力明显减弱。

2.2 MSR1对BMSC体外增殖、迁移和成骨能力的影响

由于MSR1主要在巨噬细胞膜上表达,我们在体外使用MSR1 WT和KO小鼠来源的原代巨噬细胞条件培养基对BMSC进行刺激,观察BMSC的增殖、迁移及成骨能力的变化。CCK-8实验结果显示,MSR1 WT和KO小鼠来源的原代巨噬细胞条件培养基对BMSC的增殖能力不产生影响(图2A)。此外,



A: MSR1 WT及KO小鼠胫骨骨皮质缺损后第10天骨缺损处(CT三维重建, $\times 2$); B: MSR1 WT及KO组小鼠骨缺损部位参数统计, 两组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ ($n=3$)。

图1 MSR1敲除对膜内成骨的影响

Figure 1 Effect of MSR1 knockout on intramembrane osteogenesis

Transwell结果也提示,MSR1 WT和KO小鼠来源的原代巨噬细胞条件培养基对BMSC迁移能力也不产生调控作用(图2B)。然而,茜素红和ALP染色及定量分析结果显示,与MSR1 WT组相比,MSR1 KO小鼠原代巨噬细胞条件培养基对BMSC成骨分化的作用显著减弱(图2C、D)。qRT-PCR结果同样表明,与MSR1 WT组相比,MSR1 KO小鼠原代巨噬细胞条件培养基刺激BMSC后,其成骨分化相关基因,如Col I、ALP、Ocn和Runx2的表达量均显著降低(图2E)。上述结果提示,MSR1对BMSC的成骨分化能力具有调节作用。

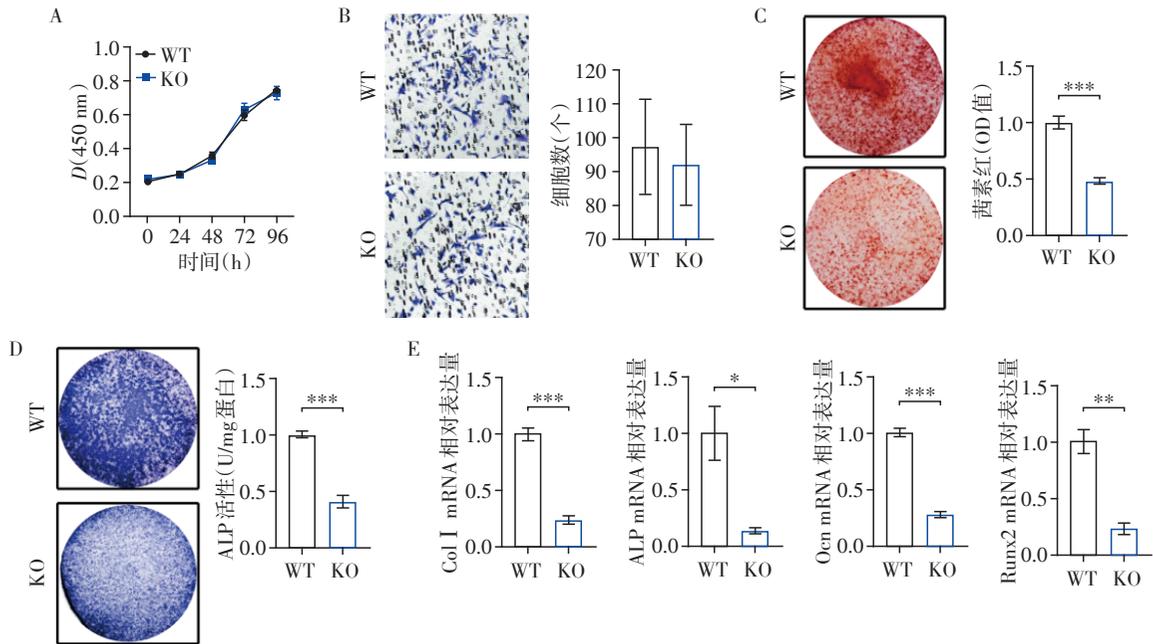
2.3 MSR1通过JAK/STAT3信号通路上调自身BMP2的分泌

为进一步明确MSR1调节BMSC成骨分化的机制,通过使用JAK的小分子抑制剂Ruxolitinib,探讨MSR1是否可通过JAK/STAT3信号通路调节BMP2的分泌,进而调控BMSC的成骨分化能力。Western

blot实验结果显示,与MSR1 WT组相比,MSR1的敲除可显著减少BMP2的产生,同时STAT3的磷酸化水平也降低(图3A)。使用Ruxolitinib后,MSR1的表达不受影响,但BMP2的表达水平和STAT3的磷酸化水平在MSR1 WT和KO组中均明显降低,提示MSR1可通过JAK/STAT3信号通路调节BMP2的表达。此外,ELISA实验结果也进一步佐证了MSR1对BMP2的调节作用(图3B)。

3 讨论

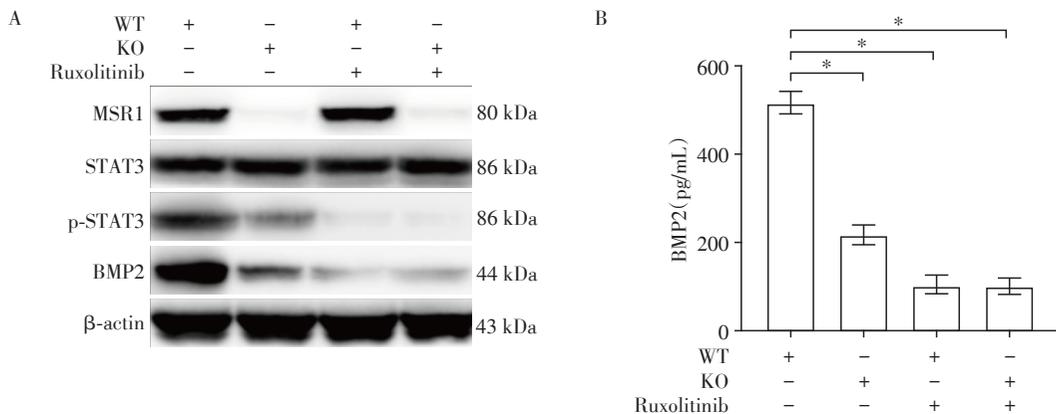
骨折不愈合或延迟愈合不仅严重损害患者的生存质量和生活质量,更会造成沉重的社会经济负担。因此探索骨再生过程中的关键分子及机制具有十分重要的意义。近年来,巨噬细胞对骨再生关键种子细胞MSC的调控作用引起研究者的重视。研究表明,巨噬细胞清除后可导致膜内成骨严重受到抑制^[9]。此外,以靶向巨噬细胞-MSC相互作用



A: CCK-8检测MSR1对BMSC增殖能力的影响; B: Transwell实验观察($\times 200$)及定量分析MSR1对BMSC迁移能力的影响; C、D: 茜素红染色($\times 2$)、ALP染色($\times 2$)及定量检测观察MSR1对BMSC成骨分化能力的影响; E: qRT-PCR实验检测成骨分化标志基因。两组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ ($n=3$)。

图2 MSR1敲除对BMSC增殖、迁移及成骨分化能力的影响

Figure 2 Effects of macrophage MSR1 on proliferation, migration and osteogenic differentiation of BMSC



A: Western blot检测MSR1 WT和KO组中MSR1、p-STAT3/STAT3和BMP2表达水平的变化; B: ELISA检测JAK/STAT3抑制剂Ruxolitinib对MSR1 WT和KO组中BMP2分泌的影响, 两组比较, $^*P < 0.001$ ($n=3$)。

图3 MSR1通过JAK/STAT3通路调节BMP2的分泌

Figure 3 MSR1 regulated the secretion of BMP2 through JAK / STAT3 pathway

用促进骨生成为策略研发新型生物支架或材料已展现出良好的前景^[10-11]。然而巨噬细胞上的何种关键分子在这一过程中发挥作用尚未阐明。本研究发现MSR1可通过JAK/STAT3信号通路上调BMP2的表达,进而正性调控BMSC向成骨细胞分化。

既往研究发现,巨噬细胞可分泌趋化因子如趋化因子2(CCL2)、基质细胞衍生因子1(SDF-1)和白介素8(即趋化因子8, CXCL8)等促进BMSC的迁移。此外,还可分泌如BMP2、OSM和PGE2等促

进MSC向成骨分化^[4,12]。而本研究也表明巨噬细胞可通过MSR1调节BMP2的分泌,进而促进BMSC向成骨分化。值得注意的是,不同细胞来源、不同的共培养条件以及不同处理方式可产生一些有争议的结论。此外,不仅巨噬细胞对MSC具有调节作用, MSC对巨噬细胞同样具有调控作用^[13], MSC可通过分泌一些趋化因子和细胞因子如CCL2、CCL4和IL-10等,参与调控巨噬细胞的迁移和极化状态。本实验重点研究了MSR1对BMSC的条件作用,而BMSC分

泌的细胞因子是否能通过巨噬细胞膜上的MSR1对巨噬细胞的功能产生影响,值得进一步研究。

JAK/STAT3信号通路是细胞内经典且十分重要的通路,JAK被磷酸化激活后可招募STAT3,使其发生磷酸化,并形成二聚体,二聚体形式的STAT3可进入细胞核,发挥对靶基因的转录调控作用^[14]。然而,在JAK的激活阶段和STAT3进入细胞核等过程中存在许多调控因素,如STAT3的翻译后修饰(泛素化、糖基化和乙酰化等)可对其转录活性起到调节作用^[14-15]。此外,JAK/STAT3信号通路可受到细胞因子信号转导抑制蛋白(suppressors of cytokine signaling, SOCS)、活化STATs蛋白抑制因子(protein inhibitors of activated stats, PIAS)、蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatases, PTP)等的负性调控^[14-16]。因此,MSR1是否对JAK/STAT3存在其他方式的调控有待进一步研究。

本研究尚存在一些不足,MSR1是否还对其他调控BMSC成骨分化的细胞因子产生调节作用尚不清楚。此外,由于细胞内信号通路极其复杂,MSR1是否还对其他信号通路存在调节作用仍需进一步明确。在体内实验中,为进一步明确MSR1对骨再生能力的调控作用,有赖于后期MSR1特异性敲除小鼠的使用。

综上,本研究发现MSR1对BMSC成骨分化具有调节作用,并且进一步揭示MSR1可通过激活JAK/STAT3信号通路上调BMP2的表达,进而有效促进BMSC的成骨分化,为今后靶向MSR1,促进骨再生提供了坚实的理论基础。

[参考文献]

- [1] GIANNOUDIS P V, ATKINS R. Management of long-bone non-unions[J]. *Injury*, 2007, 38(Suppl 2): S1-S2
- [2] PERCIVAL C J, RICHTSMEIER J T. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis [J]. *Dev Dyn*, 2013, 242(8): 909-922
- [3] 徐巧明, 凡进, 周炜, 等. GIT1通过BMP-2/p-Smad1/5/8信号通路调节骨折愈合[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(10): 1355-1359
- [4] PAJARINEN J, LIN T, GIBON E, et al. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing[J]. *Bio-materials*, 2019, 196: 80-89
- [5] KELLEY J L, OZMENT T R, LI C, et al. Scavenger receptor-A (CD204): a two-edged sword in health and disease [J]. *Crit Rev Immunol*, 2014, 34(3): 241-261
- [6] ROGERS M B, SHAH T A, SHAIKH N N. Turning bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on and off in mesenchymal cells [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(10): 2127-2138
- [7] SICA A, MANTOVANI A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3): 787-795
- [8] HE J, ZHONG X, ZHAO L, et al. JAK2/STAT3/BMP-2 axis and NF- κ B pathway are involved in erythropoietin-induced calcification in rat vascular smooth muscle cells [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2019, 23(4): 501-512
- [9] SANDBERG O H, TÄTTING L, BERNHARDSSON M E, et al. Temporal role of macrophages in cancellous bone healing [J]. *Bone*, 2017, 101: 129-133
- [10] GOODMAN S B, HWANG K L. Treatment of secondary osteonecrosis of the knee with local debridement and osteoprogenitor cell grafting [J]. *J Arthroplasty*, 2015, 30(11): 1892-1896
- [11] SANDBERG O, ASPENBERG P. Different effects of indomethacin on healing of shaft and metaphyseal fractures [J]. *Acta Orthop*, 2015, 86(2): 243-247
- [12] LU LY, LOI F, NATHAN K, et al. Pro-inflammatory M1 macrophages promote osteogenesis by mesenchymal stem cells via the COX-2-prostaglandin E2 pathway [J]. *J Orthop Res*, 2017, 35(11): 2378-2385
- [13] KIM J, HEMATTI P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages [J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(12): 1445-1453
- [14] JOHNSON D E, O'KEEFE R A, GRANDIS J R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(4): 234-248
- [15] MORRIS R, KERSHAW N J, BABON J J. The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway [J]. *Protein Sci*, 2018, 27(12): 1984-2009
- [16] 鲍军, 焦德松, 周杨, 等. SPAG5通过影响JAK2/STAT3信号通路磷酸化促进乳腺癌细胞的增殖和侵袭 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(4): 502-508, 562

[收稿日期] 2020-04-26