

辛伐他汀体外促进骨形成作用的初步研究

于纪珠 刘晓民 林春艳 朱宏

【摘要】 目的 研究辛伐他汀(Simvastatin)对成骨细胞分化、增殖及骨形成的作用。**方法** 用 RPMI 1640 培养液分别对水囊引产胎儿及新生大鼠颅顶骨进行组织培养,并将等量的胎儿或大鼠的颅顶骨组织分为实验组(辛伐他汀 $1 \mu\text{mol/L}$)和对照组,除动态观察比较不同培养液中成骨细胞的增殖状况外,将培养 7 d 后的颅顶骨组织块制成半薄或超薄病理切片,于光镜下和电镜下进行形态学观察,并用测微尺测量新生骨组织厚度,记录成骨细胞数;同时,对留取的培养液测定其中的碱性磷酸酶(AKP)及骨钙素(BGP)的含量。**结果** 在培养过程中,可见实验组胎儿和新生大鼠颅骨成骨细胞生长活跃,数量多;对照组成骨细胞生长缓慢,数量少,可见大量成纤维细胞。培养 7 d 后可见实验组胎儿及大鼠颅骨新生骨组织的厚度均明显高于对照组($P < 0.01$);其单位长度(0.3 mm)新生骨组织内成骨细胞数均明显高于对照组($P < 0.01$)。透射电镜下可见实验组成骨细胞处于活化状态,胞浆内有丰富的细胞器,少见破骨细胞,而对照组成骨细胞处于衰老状态,细胞器少见,可见大量破骨细胞。实验组培养液中 AKP 及 BGP 均明显高于对照组($P < 0.01$)。**结论** 辛伐他汀在体外实验中具有促进成骨细胞分化、增殖和促进新骨形成的作用;他汀类药物可作为预防、治疗骨质疏松症的有价值的候选药物。

【关键词】 辛伐他汀;成骨细胞;骨形态发生蛋白 2(BMP-2);骨形成;骨质疏松症

Effects of simvastatin on bone formation in vitro YU Jizhu, LIU Xiaomin, LIN Chunyan, et al. The First Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

【Abstract】 Objective To investigate the biological effects of simvastatin on osteoblast differentiation and bone formation. **Methods** Equivalent calvarial bones taken from neonatal rats or aborted fetuses were cultured in RPMI 1640 medium which contained simvastatin($1 \mu\text{mol/L}$) in experimental group during culture, osteoblast differentiation in different conditions was observed and compared. After culture, morphological changes were observed and osteoblasts were calculated under optical and electron microscope AKP and BGP levels in culture medium were assayed. **Results** Compared with control group, osteoblasts in the culture with simvastatin grew well, both the new bone volume and the number of osteoblasts were significantly large($P < 0.01$), the levels of AKP and BGP were elevated, and, under electron microscope the osteoblasts were also in active state with few osteoclasts. **Conclusion** Simvastatin has promotive effects on osteoblast differentiation and bone formation in vitro. Statins may be a valuable drug for preventing and treating osteoporosis.

【Key words】 Simvastatin; Osteoblast; Bone morphogenetic protein 2; Bone formation; Osteoporosis

骨质疏松症已成为日趋严重的公共健康问题,寻找一种能够有效刺激骨生成和骨重建且临床安全有效的药物一直是国内、外同行关注的热点。近一、二年国外研究显示他汀类药物(statins)在动物体内、外具有刺激骨形成、修复骨微结构的作用,颇有临床应用潜力^[1]。本研究分别观察了在组织培养情况下辛伐他汀(Simvastatin,杭州默沙东制药厂提供)对新

生大鼠及水囊引产胎儿颅骨细胞的刺激作用,经检索国内、外文献尚未见到有关他汀类药物对人类骨组织体外刺激作用的观察报道。

材料和方法

1. 骨组织分离及培养:无菌条件下,分别取 5 d 龄大鼠和 18 周水囊引产胎儿颅骨,经无菌冷 RPMI 1640 培养液洗涤 2~3 次后,分别将其剪切为 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 大小或 $2.5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ 大小的组织块,等量分别置于含 10% 胎牛血清(BSA)的 RPMI 1640 实验

组培养瓶(辛伐他汀 1 $\mu\text{mol/L}$)和对照组培养瓶中,在 37℃、5% CO_2 饱和湿度孵箱内培养。

2. 形态学和生化指标观察:每日定时在相差倒置显微镜下观察两组细胞的形态及生长过程。培养 7 d 后,将骨组织块(2.5 mm $\times$ 5 mm)制成病理切片,半薄切片及超薄切片于光镜下及电镜下进行形态学观察,并留取培养液测定其中的碱性磷酸酶(AKP)及骨钙素(BGP)含量。

3. 本研究中的各种计算数值均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果用成组资料 t 检验进行统计处理。

结 果

1. 培养过程中形态学观察:培养的最初 1~3 d,两组均可见大量小而圆的细胞游出,以造血细胞为主。随培养时间延长,这些细胞逐渐坏死、破碎。培养 3~7 d 后,实验组骨组织块周围细胞生长活跃,可见大量圆形或近立方细胞,有的甚至融合成片,核

圆,位于细胞中间,钙-钴染色阳性,胞浆呈灰黑色,为成骨细胞,而对照组细胞生长缓慢,数量少,可见大量成纤维细胞。

2. 组织病理学检查:于光镜下观察骨组织切片可见实验组成骨细胞为椭圆形或矮柱状,处于活化状态,数量多;对照组成骨细胞为扁平形,趋于衰老,数量少。用测微尺测量新生骨组织厚度,记录成骨细胞数,结果见表 1。透射电镜下观察,可见实验组的成骨细胞呈方形、椭圆形或不规则形,细胞核大而圆,位于细胞离质远的一侧,其染色质分散而细,胞浆内有丰富的细胞器如线粒体、粗面内质网,高尔基体等,破骨细胞少见。对照组的成骨细胞呈扁梭形,胞浆内细胞器少,可见大量破骨细胞及溶酶颗粒;实验组的新生骨基质较对照组明显。

3. 培养 7 d 后实验组及对照组培养液中 AKP 及 BGP 测定结果见表 1。

表 1 大鼠及胎儿颅骨新生骨组织厚度、成骨细胞数、培养液中 AKP、BGP 水平

组别	例数	新生骨组织厚度 (mm)	成骨细胞数 (个/0.3 mm)	AKP (U/L)	BGP ($\mu\text{g/L}$)
对照组(鼠)	8	0.16 $\pm$ 0.02	64 $\pm$ 3	157 $\pm$ 29	0.05 $\pm$ 0.02
实验组(鼠)	8	0.25 $\pm$ 0.01*	98 $\pm$ 5*	228 $\pm$ 28*	0.13 $\pm$ 0.04*
对照组(胎儿)	8	0.27 $\pm$ 0.03	94 $\pm$ 4	139 $\pm$ 26	1.17 $\pm$ 0.32
实验组(胎儿)	8	0.32 $\pm$ 0.02*	112 $\pm$ 6*	200 $\pm$ 23*	2.00 $\pm$ 0.51*

注:与对照组比较 * $P < 0.01$

讨 论

他汀类药物是临床已被广泛、长期应用的一类降脂药物,它是一种 HMG-CoA 还原酶抑制剂,口服具有活性,且具有良好的安全性。近年来,国外研究相继发现此类药物具有广泛的非降脂作用,如预防心血管疾病、免疫抑制作用、抗增殖、治疗恶性疾病以及预防肾病的作用。1999 年 12 月 Mundy 等^[1]首先报告了他汀类药物具有促进成骨细胞分化及新骨形成的作用,随后数项流行病学研究结果也显示他汀类药物可以降低老龄人群骨折的危险性,使骨密度增加。我们除了对新生大鼠颅骨组织进行了培养观察外,还在国内、外率先对辛伐他汀对引产胎儿颅骨组织的刺激作用进行了观察研究,并测定了新生骨组织厚度及成骨细胞数等指标,得到了与 Mundy 等研究结果相一致的结果。

国外研究提示,他汀类药物可能主要通过 BMP-2 介导其刺激骨形成和骨微结构的重建。BMP-2 是一种促进成骨细胞分化的自分泌-邻分泌因子,与成

骨细胞分化密切相关^[2],它是骨源性生长因子家族中的一员。这个家庭包括转化生长因子家族中的同系物及其他一些因子,如胰岛素样生长因子(IGFs)、成纤维细胞生长因子(FGF)及血小板源性生长因子(PDGF)。这些生长因子都溶于骨基质中,在骨吸收时以活化形式释放出来。转化生长因子家族使成骨细胞具有向吸收后的缺损部位移动的趋化性,这是启动骨形成过程和刺激骨细胞前体增殖所必需的,它与骨重建过程中破骨细胞的程序性死亡及终止骨吸收过程有关。BMPs 可以加强成骨细胞分化,包括刺激骨结构蛋白,如 I 型胶原蛋白的表达及骨基质的矿化^[3]。已经发现 BMP-2 应用于动物体内骨表面时,有很强的促进新骨形成的作用。我们的研究还发现,引产胎儿及新生大鼠颅骨组织培养后,实验组的 AKP 及 BGP 较对照组相比均明显增高($P < 0.01$),而 AKP 及 BGP 均为反映成骨细胞活性的重要指标。部分学者认为,辛伐他汀可能启动了 BMP-2 的转录和翻译,从而加强了成骨细胞的增

(下转第 157 页)

密集的排列成束的胶原纤维伸入到材料的微孔内,钙沉积呈串珠样钙小球。8~12 周骨胶原增多,钙盐颗粒沉积明显。CPC 组:4~6 周,胶原纤维紊乱,8~12 周,材料与骨床间胶原纤维和钙盐颗粒沉积增多。以上三种植入材料均与宿主骨界面呈明显的骨结合。

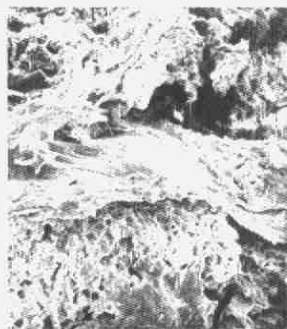


图 3 胶原纤维包绕并长入材料中(4 周)



图 4 多层新生骨向材料中延伸(6 周)

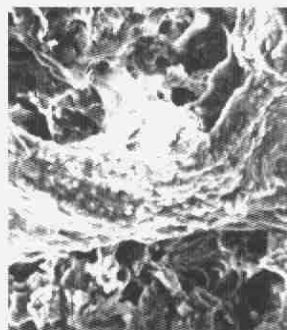


图 5 增粗的胶原纤维束长入材料中(8 周)



图 6 胶原纤维增粗,钙盐沉积增多(10 周)

讨 论

胶原基纳米骨(nHAC),是基于仿生骨观念制成的骨替代材料^[2]。采用提纯并去抗原的 I 型胶原为模板,在钙-磷盐溶液中调制矿化,通过 PH 值的调节来获得复合材料。此材料不仅矿物相为含有碳酸根的 HA,晶粒度低,晶体尺寸在纳米量级。其结构与天然骨中胶原和矿物的组装结构相同^[3]。该矿化胶原基材料的成份比例也与天然骨相似。另外,通过

三维造孔技术,胶原基纳米骨多孔框架材料具有与天然松质骨类似的三维孔洞网络结构,孔径为 50~300 μm 。nHAC 为一种新型的多孔矿化材料,其成功研制解决了仿生骨的制作难题。实验表明,组织切片见骨缺损周边增生的纤维组织向多孔的框架网孔中穿插长入,呈条索或小梁状结构,并有明显的骨小梁形成,新生骨小梁周边有大量的成骨细胞排列,材料周边与骨板已形成骨性连接,植入材料逐步被降解吸收,由纤维组织和新生骨替代。扫描电镜见胶原纤维密集平行排列并汇集成束,基质中可见分布均匀的钙颗粒。新生骨组织自宿主骨边缘向材料中长入与宿主骨界面呈骨性结合。本研究表明:nHAC 和 Bio-Oss 与 CPC 不同,前两者都具有矿化多孔框架系统。这种多孔框架结构能引导增生的纤维组织呈条索或小梁状结构向材料中穿插长入。材料中的多孔框架结构成为了理想的钙盐沉积支架。nHAC 与 Bio-Oss 成骨特点较类似。只是成骨量 8 周以内 nHAC 尚不如 Bio-Oss,而到 12 周时已接近 Bio-Oss 成骨水平,nHAC 与 CPC 相比同期成骨量大。另外,在 nHAC 组中,还见到了软骨成骨现象,故 nHAC 除了本身具有骨引导性外,可能还具有一定的骨诱导性。此种情况需进一步研究。本实验证明了胶原基纳米骨的生物相容性和骨引导性,是一种较为理想的颌骨植入材料。

致谢:感谢中日友好临床医学研究所电镜室和动物室的支持帮助

参 考 文 献

- 1 廖素三,崔福斋,张伟.组织工程中胶原基纳米骨复合材料的研制.中国医学科学院学报,2003,25(1):36-38.
- 2 Du C, Cui FZ, Zhang W, et al. Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix. J Biomed Mater Res, 2000,50:518-527.
- 3 Weiner S, Wagne HD. The material bone: structure-mechanical function relations. Annu Rev Mater Sci 1998,28:271-298.

(收稿日期:2004-03-19)

(上接第 231 页)

殖、分化及新骨形成,但其具体作用机制尚不明确。本研究结果提示,他汀类药物有望成为预防和治疗骨质疏松症的理想药物。

参 考 文 献

- 1 Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in

vitro and in rodents by statins. Science, 1999,286:1946-1949.

- 2 Mundy GR, Boyce B, Hughes D, et al. The effects of cytokines and growth factors on osteoblastic cells. Bone, 1995,17:17-75S.
- 3 Harris SE, Bone wald LF, Harris MS, et al. Effects of TGF on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein-2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase and type I collagen mRNA in prolonged cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. J Bone Miner Res, 1994,9:855-863.

(收稿日期:2003-09-01)