

辛伐他汀在骨髓基质干细胞向成骨细胞分化过程中的作用

曲强 郭伟 陈翠珠

【摘要】 目的 通过对小鼠骨髓干细胞体外培养的观察,研究辛伐他汀在骨髓基质干细胞向成骨细胞定向分化过程中的作用。方法 取雄性6周ICR小鼠股骨骨髓基质细胞进行原代和传代培养,应用组织化学及 von Kossa 方法检测细胞碱性磷酸酶染色和细胞外基质矿化;在细胞培养早期加入辛伐他汀(实验组)或保持基础培养条件(对照组),应用半定量 RT-PCR 方法分别检测两组 I 型胶原蛋白(COL1)、碱性磷酸酶(ALP)、转录因子 CBFA1 和 Osterix(OSX)在成骨细胞分化过程中的表达。结果 小鼠骨髓基质细胞经体外诱导后分化为具备碱性磷酸酶活性和矿化细胞外基质的成熟成骨细胞。实验组 COL1、ALP 和 CBFA1 表达在细胞培养第 3、5 天均高于对照组,OSX 表达差异不明显。结论 辛伐他汀在成骨细胞分化过程中促进其相关基因的表达。

【关键词】 骨髓干细胞;成骨细胞;细胞增生;细胞分化

Effect of simvastatin on differentiation of osteoblasts derived from bone marrow stem cells. QU Qiang*, GUO Wei, CHEN Cuizhu.* Department of General Surgery, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China

【Abstract】 Objective To study the effect of simvastatin on osteoblast differentiation by using a mouse bone marrow culture system. **Methods** Bone marrow cells were derived from 6-week-old ICR mice. Dexamethasone was initiated in the cultures. Alkaline phosphatase staining and von Kossa staining were used to assess osteoblast differentiation. Semi-quantitative RT-PCR was performed for evaluating the expressions of collagen type I (COL1), alkaline phosphatase (ALP), CBFA1, and Osterix on culture days 3 and 5, in the simvastatin-(treated) group and blank control group. **Results** Cells in each group were differentiated into osteoblast lineage, as shown by alkaline phosphatase and von Kossa stainings. The expressions of COL1, ALP and CBFA1 in the treatment group was higher than those in the control group. **Conclusion** Simvastatin enhances the expression of osteoblast-differentiation-related genes.

【Key words】 Osteoblast; Simvastatin; Bone marrow stem cell; Cell differentiation

骨髓基质干细胞又称为间充质干细胞(Mesenchymal stromal cell, MSC),具有自我增生及多向分化潜能。MSC在适当诱导条件下可向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和肌细胞等多种细胞分化^[1]。在MSC向成骨细胞分化过程中,地塞米松(Dexamethasone, DEX)被证实起着重要的诱导作用^[2]。辛伐他汀(Simvastatin, SIM)作为他汀类药物是脂类代谢途径中限速酶 HMG-CoA 还原酶的抑制剂,被认为有降

血脂作用。近年来研究表明,他汀类药物在体外可促进骨形成过程中碱性磷酸酶活性,增加细胞外基质矿化^[3]。SIM对MSC向成骨细胞分化是否有诱导作用目前尚不清楚。

我们利用已建立的小鼠MSC体外培养模型^[4],应用DEX诱导分化成骨细胞,并在细胞培养早期加入SIM,通过对比分析成骨细胞特异性标记物I型胶原蛋白(COL1)、碱性磷酸酶(ALP)以及转录因子CBFA1、Osterix(OSX)的表达,证实SIM具有促成骨细胞分化作用。

材料和方法

1. 细胞培养

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070367)

作者单位:100730 北京,中国医学科学院北京协和医院基本外科(曲强);华北煤炭医学院附属医院骨科(郭伟);中国医学科学院北京协和医院医学实验中心(陈翠珠)

曲强 E-mail: qiangqu@hotmail.com

(1)原代细胞培养:取6周ICR雄性小鼠(北京大学医学实验动物科学部),颈椎脱位法处死后,于无菌条件下取出双侧股骨,去除股骨双侧干骺端,以25G针头用 α -MEM冲洗骨髓腔,收集骨髓细胞于50 ml离心管中。1000 r/min离心10 min,弃上清,细胞重悬后计数有核细胞,并接种细胞于培养瓶或培养板中,加入条件培养液 α -MEM培养基,15%标准胎牛血清,50 μ g/ml维生素C,10 mmol/ml β -甘油磷酸钠,10 000 U/ml青链霉素。实验组同时加入 10^{-6} mol/L辛伐他汀(Merck公司),对照组加入等量PBS溶液。细胞于5%二氧化碳培养箱37 $^{\circ}$ C培养,隔日更换半量培养液。

(2)传代细胞培养:原代细胞培养5 d,PBS冲洗2次,0.05%胰蛋白酶-EDTA消化后,1000 r/min离心10 min,弃上清,加入适量 α -MEM重悬细胞共计数,种植于培养瓶或培养板中,隔日半量换液。

2. 碱性磷酸酶和细胞外基质染色:

传代培养细胞以 10^3 个细胞/孔接种于35 cm培养皿中,分别于第7,22天以4%中性甲醛固定细胞。细胞碱性磷酸酶染色采用Sigma公司试剂盒方法,细胞外基质钙沉积染色采用von Kossa方法。

3. 成骨细胞分化相关基因表达的检测

细胞总RNA采用Trizol(Promega公司)一步法提取。取2 μ g总RNA进行反转录,反应体系含0.5 μ g/ μ l Oligo dT 2 μ l,10 mmol/L dNTP 1.5 μ l,40 U/ μ l RNA酶抑制剂1 μ l,200U/ μ l M-MLV RT酶1 μ l,及反应缓冲液共25 μ l,37 $^{\circ}$ C反应60 min。取2.5 μ l cDNA作为模板于25 μ l反应体系中进行PCR。PCR引物分别为:CBFA1正链:ccaaattgcctaaccagaatg,反链:gsg-gctgtgtttcaaacac; GAPDH正链:caccatggsgccgggg,反链:gacggacacattggggtag; ALP正链:gccctctcaagacatata,反链:ccatgatcacgtcgatatacc; COL1正链:tctcactctcttagttcct,反链:ttgggtcattccacatg,OSX正链:atggcgtcctctctgttgagg,反链:accaaggagtaggtgtgtgcct。PCR反应为95 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min 35个循环。循环反应完毕后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。产物取8 μ l于1.5%琼脂糖凝胶电泳,溴化已锭染色,利用凝胶成像系统(Bio-Rad Gel Doc2000)进行光密度扫描,求取每一样品和GAPDH的光密度比值。

结 果

小鼠骨髓基质细胞在含有 10^{-8} mol/L地塞米松、 β -甘油磷酸钠、抗坏血酸及10%胎牛血清条件培养基中2 d后细胞开始贴壁变形,多呈梭形,少数是小

圆形或三角形。原代培养5 d后进行传代,传代的细胞约2 h后开始贴壁,细胞形态较均一,少数细胞呈多边形,胞核大而圆。原代培养及传代培养早期均可见处于有丝分裂期细胞形态。

细胞传代培养后7 d,我们对细胞行ALP组织化学染色。此时细胞呈小结样聚集,胞浆中出现粉红色ALP染色(图1)。传代培养20 d时我们以von Kossa方法染色细胞外基质,发现细胞外基质小结样结构区可见点状及小片状钙沉积染色。

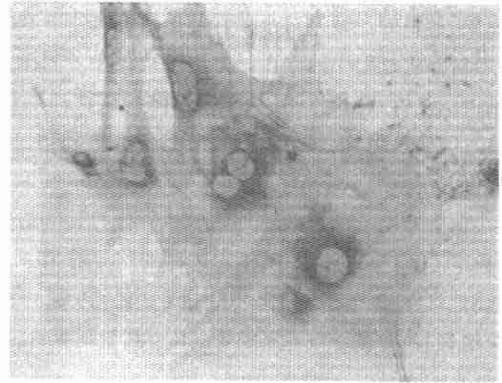


图1 ALP组织化学染色

骨髓基质干细胞经诱导培养后,胞浆中出现具有成骨细胞分化标志的粉红色ALP染色。

我们在经地塞米松诱导的小鼠骨髓基质细胞原代培养中加入 10^{-6} mol/L辛伐他汀后,于培养第3,5天实验组和对照组中分别提取总RNA,用RT-PCR方法扩增成骨细胞分化过程中特征性标记物COL1、ALP、CBFA1和OSX,并对其扩增产物进行半定量分析。我们发现在原代培养第3天时CBFA1已有表达,第5天时COL1、ALP和CBFA1均有表达,OSX表达在2个时间点均低于检测水平(图2)。实验组ALP、COL1和CBFA1的表达均明显高于对照组,显示辛伐他汀在骨髓基质细胞向成骨细胞分化早期促进成骨细胞成熟(图3)。

讨 论

骨髓基质干细胞具有不断自我增生和在特定条件下定向分化的特性。DEX被认为在体外可促进成骨细胞分化与细胞外基质的矿化。在我们的细胞培养体系中,从形态学、组织化学染色、基因表达和细胞外基质染色等多方面观察表明,MSC经DEX诱导可定向分化为成熟成骨细胞。

转录因子CBFA1和OSX是近年来发现的在转录水平调控成骨细胞分化的关键因子。其中OSX被认为是作用于CBFA1下游。两种转录因子均可

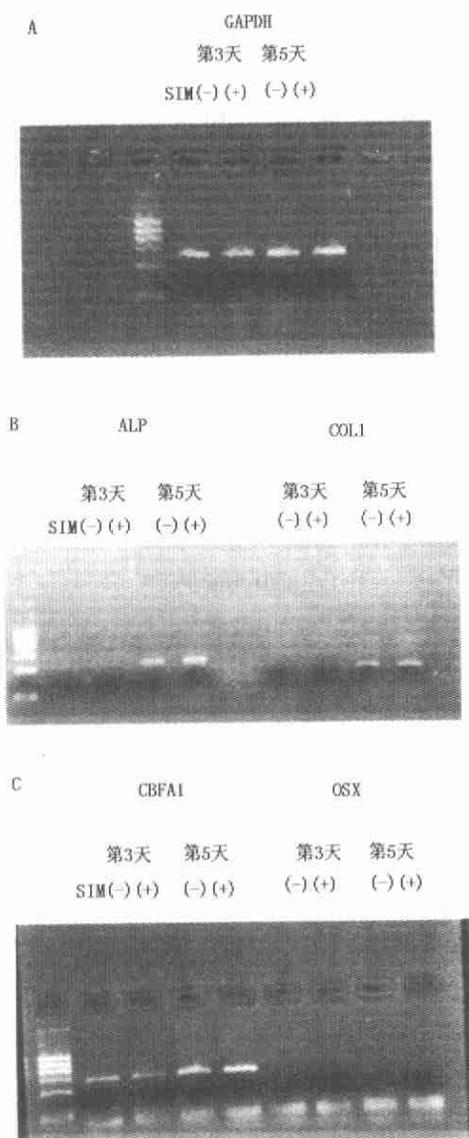


图2 成骨细胞分化过程中特征性标记物表达
辛伐他汀(SIM)实验组(+)与对照组(-)在细胞培养第3,5天
表达 GAPDH(A)、ALP 和 COL1(B)、CBFA1 和 OSX(C)情况。

调控成骨细胞特异性基因如碱性磷酸酶和骨钙素的表达,当 CBFA1 和(或)OSX 缺失时,机体表现为无成骨细胞分化和骨发育不良。我们通过定位观察,明确显示 CBFA 在骨髓干细胞分化早期特异性表达于细胞核基质,随着细胞分化成熟,CBFA1 持续结合于具有分化成骨细胞特征的细胞核内,在时间上与参与促进其他成骨细胞标志物的表达相一致,提示 DEX 可能通过早期提高转录因子水平而发挥其促分化作用^[5]。

辛伐他汀长期以来被用作降血脂药物,近年大样本流行病学调查发现长期服用他汀类药物人群骨折发生率小于对照人群^[6]。体外实验也显示 SIM 促进 MC3T3-E1 细胞分化并成骨。本实验中 SIM 在 MSC 原代培养中加速并提高了 COL-1 和 ALP 的表达,CBFA1 表达在培养第 5 天 SIM 实验组也高于对照组,证实 SIM 在成骨细胞分化早期起着与 DEX 协同的促分化作用。其可能机制为 SIM 通过提高 BMP-2 水平促进 COL-1 和 ALP 等成骨细胞相关蛋白的合成,而 BMP-2 水平升高是由于:①他汀类的内脂环结构类似细胞内蛋白酶抑制剂,后者促进转录增强子进入细胞核,增强目标基因表达;②他汀类药物刺激内皮细胞一氧化氮合成酶(eNOS)活性,进而启动 Raf-1 和 MAP 信号传导系统,增强转录活性及目标基因表达^[7]。OSX 表达在两个时间点均低于检测水平,可能与成骨细胞分化早期基因时序表达程度有关。SIM 的作用途径还有待进一步研究。

随着人们对老年及妇女绝经后骨质疏松现状和发生机制的深入了解,治疗骨质疏松的药物也在不断研究和发展中。但是,目前骨质疏松治疗多集中在抑制破骨细胞功能,进而减少骨破坏,达到控制骨

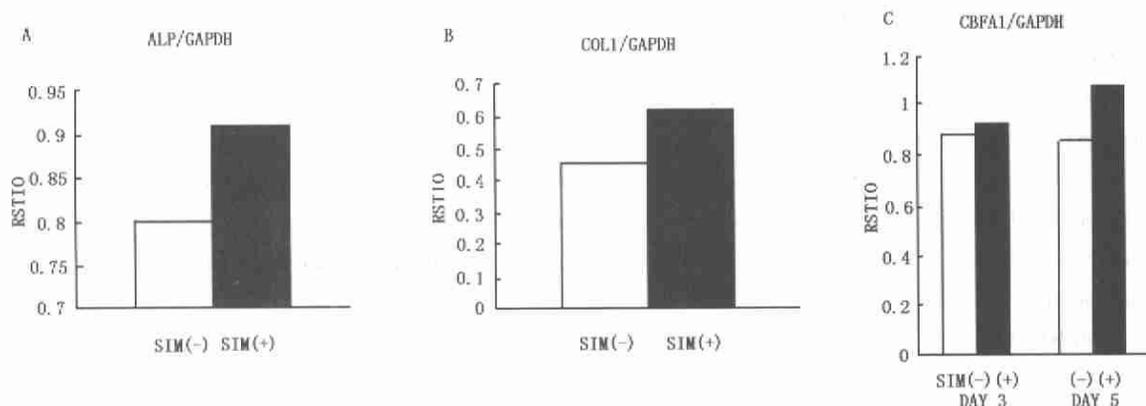


图3 辛伐他汀作用

辛伐他汀(SIM)实验组(+)与对照组(-)在细胞培养第3天表达 ALP(A)和 COL1(B)以及第3,5天表达 CBFA1(C)水平比较。

讨 论

机体通过激素的动态平衡来调节、维持正常骨代谢。去势大鼠内服活骨胶囊、外敷抗骨坏死散两药联用可能调节机体的这些动态变化而改善了骨的代谢。通过以上结果表明:模型组4项骨力学指标明显低于对照组($P < 0.05 \sim 0.01$),骨形态学指标及雌激素测定结果也明显低于对照组,说明采用3月龄雌性大鼠切除双侧卵巢后可造成一系列骨质改变。活骨胶囊、抗骨坏死散两药联用大、中、小剂量组的骨力学最大载荷、最大挠度、最大应力、弹性挠度与模型组比较有明显增强($P < 0.05 \sim 0.01$)。不脱钙骨切片结果显示:骨钙化光密度值及骨小梁与髓腔面积比值,给药组中大剂量组明显增加。未钙化骨的酸性黏多糖物质给药组明显降低。血清雌激

素测定结果提示活骨胶囊、抗骨坏死散两药联用有明显增高体内雌激素含量,对子宫重量无明显作用。综上所述,活骨胶囊、抗骨坏死散两药联用有明显改善骨组织结构,提高去势大鼠骨结构力学,使骨组织承载能力趋于正常,对改善和治疗骨质病变如股骨头坏死、骨质疏松等病痛有一定的治疗作用,其机理尚待进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 丁桂芝,曾天舒,周勇,等.补肾中药对去势大鼠骨生物力学影响的研究.中国中医骨伤科杂志,1995,3:1-3.
- 2 崔洪英,张柏丽,安秀玲,等.补肾中药对骨质病变大鼠骨形态的影响.天津中医,1997,14:226-227.
- 3 黎小坚,Harold MF,朱绍舜,等.基础骨生物学新观.中国骨质疏松杂志,2001,7:152-165. (收稿日期:2003-12-29)

(上接第318页)

应严密缝合,避免创口裂开。拔牙创如张力过大,可行龈粘膜骨膜剥离松解,缝合牙龈,压迫止血,这样有利于血液供应及创口愈合。⑤注意口腔卫生,减少创口损伤。因临床应用时间较短,例数有限,远期疗效有待进一步观察。

参 考 文 献

- 1 廖素三,崔福高,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,2003,25:36-38.
- 2 张丽军,王影,吴燕丽,等.胶原基纳米骨修复兔下颌骨缺损的实验研究.中国骨质疏松杂志,2004,10:155-157
- 3 徐莉译,欧阳翔英校.多孔矿化骨 Bio-oss 和胶原膜 Bio-Gide 治疗牙周骨缺损的临床、X线和组织学评价 精粹中国口腔医学继续教育杂志. (收稿日期:2004-06-10)

(上接第321页)

质疏松发展的目的。以人工重组甲状旁腺激素(PTH)为代表的通过刺激成骨细胞功能,进而促进骨合成代谢的新一代药物已开始服务于临床。他汀类药物作用机制的研究有可能为通过骨合成代谢途径治疗骨质疏松提供新的方法。

参 考 文 献

- 1 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 1999,284:143-147.
- 2 Owen M, Friendenstein AJ. Stromal stem cells: Marrow-derived osteogenic precursors. Ciba Found Symp, 1988, 136:42-60.

- 3 Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, et al. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cell. Biochem Biophys Res Commun, 2001,280:874-877.
- 4 Qu Q, Perä-Heape M, Kapane A, et al. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. Bone, 1998, 22:201-209.
- 5 曲强,万新海,陈翠珠.转录因子 cbfa1 在骨髓干细胞向成骨细胞分化过程中的表达.中华实验外科杂志,2003,20(3):62-63.
- 6 Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. Science, 1999,286: 1946-1949.
- 7 Whitfield JF, Morley P, Willick GE. The control of bone growth by parathyroid hormone, leptin and statins. Crit Rev Eukary Gene Expre, 2002,12:23-51. (收稿日期:2003-10-23)