

· 论 著 ·

辛伐他汀在人骨髓基质干细胞向成骨细胞分化过程中的作用

白宇 张柳 吕志伟 曲强

摘要: **目的** 观察辛伐他汀对体外培养的人骨髓基质干细胞 (Human Bone Marrow Stromal cells, hBMCs) 成骨分化功能的影响, 探讨其刺激成骨的作用机制。**方法** 体外培养来自于外伤所致股骨颈骨折患者的骨髓基质干细胞, 传代后实验组加入 1×10^{-7} mol/L 的辛伐他汀, 在不同时间点采用 ELISA 检测核转录因子 1 (Core Binding Factor 1, Cbfa 1) 与 DNA 的结合活性, 碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, ALP) 比活性, 及放射免疫法检测骨钙素 (Osteocalcin, OCN) 含量。**结果** 在辛伐他汀作用后, 实验组与对照组比较, 实验组 Cbfa 1 因子与 DNA 的结合活性增高, ALP 比活性增高且骨钙素含量增加。**结论** 1×10^{-7} mol/L 辛伐他汀能够促进人骨髓基质干细胞成骨分化, 此种促进作用可能与辛伐他汀增加其分化过程中相关转录因子的活性有关。

关键词: 骨髓基质干细胞; 成骨细胞; 活性; 辛伐他汀; Cbfa 1; ALP; OCN

The effect of simvastatin on the osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells BAI Yu, ZHANG Liu, LU Zhiwei et al. Department of Orthopaedic Surgery, the Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Simvastatin on function of osteoblastic cell differentiation of human bone marrow stromal cells (hBMCs) *in vitro*, and to study the mechanisms of anabolic effect of Simvastatin on bone formation. **Methods** hBMCs from patients underwent artificial femoral head replacement after femoral neck fracture was cultured *in vitro*. After being added with 1×10^{-7} mol/L of Simvastatin, the changes of Cbfa 1 activity were examined by ELISA, the changes of alkaline phosphatase (ALP) activity were examined by ALP measurement Kit, and the changes of osteocalcin were examined by radioimmunologic assay. **Results** After the supplementation of Simvastatin, the activity of Cbfa 1 in hBMCs increased, and the level of ALP and osteocalcin (OCN) also increased compared with the control group which did not receive Simvastatin. **Conclusion** Simvastatin can stimulate osteoblastic differentiation with increased ALP activity and OCN production while promoting the activity of Cbfa 1 *in vitro*. These results may be parts of the mechanisms of anabolic effect of Simvastatin on bone formation.

Key words: Bone marrow stromal cells; Osteoblast; Activity; Simvastatin; Cbfa 1; ALP; OCN

人骨髓基质干细胞是一种具有多分化潜能的细胞, 可以分化为成骨细胞、脂肪细胞、成软骨细胞、生肌细胞, 甚至神经细胞等, 是一种优良的种子细胞^[1]。研究发现, 用于治疗高脂血症的他汀类药物还可以刺激骨的形成, 有成骨作用^[2,3]。1999 年, Mundy 等^[4]首次发现 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A, 即他汀类药物能够促进骨组织的形成。但是, Makiz

等^[5]又发现他汀类药物, 包括辛伐他汀 (Simvastatin) 并无成骨作用, 目前对于辛伐他汀在成骨中的作用仍存在着争议。

核结合因子 a1 又称为多瘤病毒增强子结合蛋白 2 α A (polyomavirus enhancer binding protein 2 α A, PEBP 2 α A)、急性髓性白血病因子 3 (acute myelocytic leukemia 3, AML 3)、Runt 相关转录因子 2 (runt related transcription factor 2, Runx 2) 和成骨细胞特异性因子 2 (osteoblast specific factor 2, OSF 2)^[6]。Cbfa 1 控制着成骨细胞分化的启动, 早期可以促进成骨细胞的分化, 晚期则抑制其分化^[7-10]。Cbfa 1 是

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (C2006000580)

作者单位: 063000 唐山, 华北煤炭医学院附属医院骨外科 (白宇、张柳、吕志伟); 协和医大基本外科 (曲强)

通讯作者: 张柳, Email: zhliu130@sohu.com

OB 分化和功能的中心调控因子,是 OB 分化最早且最具特异性的标志,研究中表明,Cbfa 1 因子活性的提高需要 MAPK(miyogen-activated protein kinase)途径的丝、苏、酪氨酸残基磷酸化来完成^[11,12]。Cbfa 1 可与 OCN 基因(Bgp)的启动子区 OB 特异性的顺式作用元 OSE(osteoblast-specific cis-acting element)2 结合,是 OB 分化所必需的^[13],它含有能与转录因子 Cbfa 1 位点结合的核心序列^[8]。

1 材料和方法

1.1 材料

在征得患者同意的前提下,于华北煤炭医学院附属医院取 8 例成人因外伤股骨颈骨折患者行股骨头置换时收集的骨髓和松质骨,患者术前无代谢性骨病和他汀类药物服用史,其中男女各 6 例,平均年龄 48.5 岁。DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司),青霉素及链霉素、胰蛋白酶、胎牛血清(美国 Hyclone 公司),辛伐他汀(Merck), β -甘油磷酸钠、维生素 C(美国 Sigma 公司),碱性磷酸酶试剂盒(南京建成公司),BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Pierce 公司),Nuclear Extract Kit 核蛋白提取试剂盒、TransAM AML-3/RUNX 2 核转录因子活性检测试剂盒(美国 Active Motif 公司),骨钙素放免试剂盒(北方生物技术研究所以)。

1.2 方法

1.2.1 hBMCs 的体外培养。于股骨颈骨折患者行股骨头置换术扩髓时抽取骨髓,收集松质骨。用 DMEM,反复冲洗松质骨,把收集到的细胞与骨髓经离心去除上层脂肪后,反复吹打成单细胞悬液,利用 percoll 分离液(1.073 g/mL)分离单个核细胞,加入完全培养基(含青霉素、链霉素各 100 U/mL,10% 胎牛血清,10 mmol/L 的 β -磷酸甘油钠,50 mg/L 的维生素 C,普通高糖 DMEM),以 $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 种植于培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 的湿化气孵箱中进行原代培养,每例患者所得细胞单独分开培养,48 h 后半量换液,以后每 3 d 全量换液。原代培养 8~11 d 后细胞汇合成单层,按 1:3 的比例传代,细胞计数后接种到培养瓶或培养皿中,分两组:实验组[Sim(+)]采用含 1×10^{-7} mol/L 辛伐他汀的条件培养液(辛伐他汀溶于 75% 乙醇,乙醇的浓度为 0.05%),对照组采用不含辛伐他汀的完全培养液(含有与实验组所加入辛伐他汀等量的乙醇)。持续培养,常规换液,观察细胞的生长情况,拍照记录。

1.2.2 ELISA 检测 Cbfa 1 的活性。分别于传一代后

辛伐他汀作用的第 3、6、12 d,收集细胞,用 Nuclear Extract Kit 核蛋白抽提试剂盒提取各组细胞蛋白质,用 BCA 比色法测定各样品蛋白质含量。采用 TransAM AML 3/RUNX 2 核转录因子活性检测试剂盒检测。此试剂盒包含 96 孔板,孔板底面包被有 Cbfa 1 共有结合序列的寡核苷酸(5'-AACCACA-3'),核提取物中所包含的有活性的 Cbfa 1 因子特异性地结合到这个寡核苷酸。这是一种基于 ELISA 的最新 Cbfa 1 活性检测试剂盒,其灵敏度为常规凝胶电泳迁移率分析法(EMSA)的 10 倍。方法:准确吸取各组细胞蛋白质抽提物 5 μg 并用细胞裂解液稀释至 20 μL ,加于预包被有 Cbfa 1 特异的寡核苷酸双链探针的 96 孔板中,设阳性对照 5 μg Saos-2 细胞蛋白质抽提物,稀释于 20 μL 裂解液中,及空白对照(裂解液),于室温振荡(100 r/min)反应 1 h;洗板 3 次,加稀释的 Cbfa 1 单抗(1:1000)100 μL /孔,室温反应 1 h;洗板后加稀释的辣根过氧化物酶(HRP)交联的二抗(1:1000)100 μL /孔,室温反应 1 h;洗板后加显色液避光显色 5~10 min;加终止液终止,用全自动酶标仪(美国 Bio-Rad)在波长 450 nm,参比波长 655 nm 处测定吸光度,以吸光度值大小表示被测样品 Cbfa 1 活性的高低。在实验中设置竞争性对照,以示检测的特异性:特异性竞争抑制试验在加样孔中加入 20 pmol/孔的 Cbfa 1 寡核苷酸双链探针,非特异竞争抑制实验则加入非特异性的其他双链探针,其余步骤同前。

1.2.3 ALP 比活性的测定。传代细胞以 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于 6 孔板中,在传代后辛伐他汀作用的第 3、6、12 d 收集细胞,在细胞中加入细胞裂解缓冲液(Tris-HCl pH 7.5,含 0.1% Triton X-100)100 μL ,超声细胞粉碎仪破碎细胞,离心,取上清。用 ALP 检测试剂盒检测裂解细胞的上清液,并用 BCA 蛋白定量试剂盒分别定量总蛋白。计算出细胞内 ALP 比活性,单位为 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.4 OCN 含量的检测。传代细胞辛伐他汀作用后的第 6、12、18 d 取上清液,采用骨钙素放免试剂盒检测, γ 计数器测定沉淀物每分钟计数值(counts per minute, cpm),根据标准品曲线得到样品骨钙素含量。

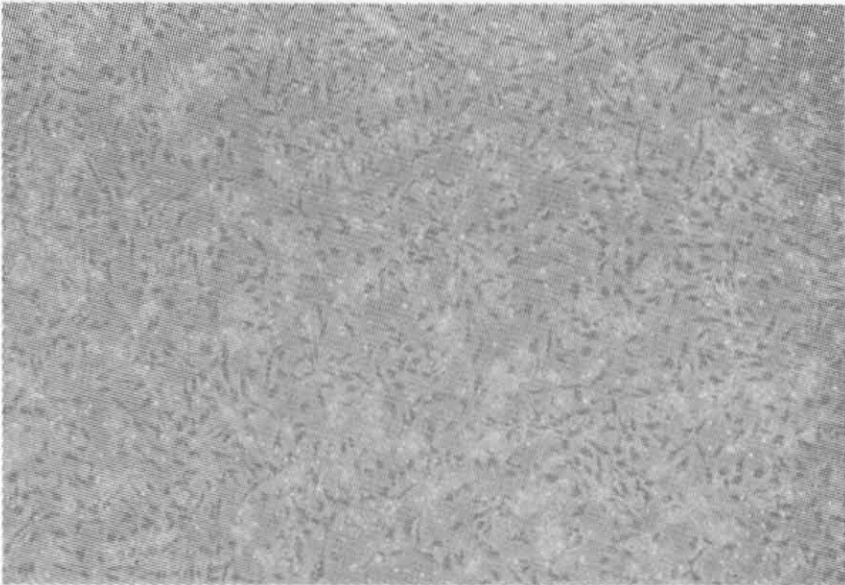
1.3 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计软件对数据进行 t 检验,对结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

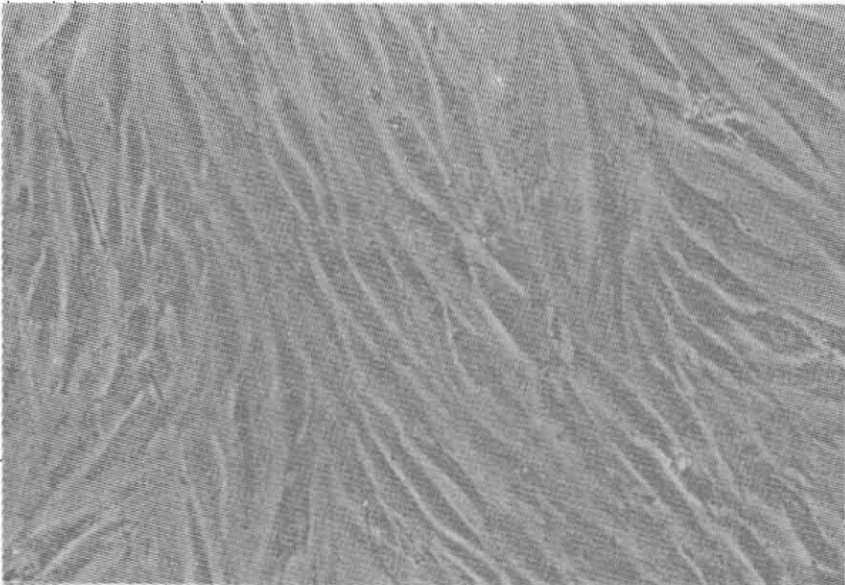
2 结果

2.1 倒置显微镜下细胞形态的观测

人骨髓基质细胞刚接种时,有大量的单个核细胞悬浮。8~10 h 后开始贴壁,2 d 后少数贴壁细胞呈梭形,以后细胞呈克隆样生长。随着换液次数的增多,悬浮的细胞逐渐被清除,培养 8~11 d 长满瓶底。传代后的细胞 3~5 h 贴壁。



A:原代细胞贴壁较慢,24 h 后逐渐贴壁,早期培养瓶中有大量悬浮细胞且以造血细胞居多,贴壁细胞逐渐形成集落,细胞形态多为梭形(倒置相差显微镜×40)



B:传代细胞多呈梭形或不规则、三角、多角形,生长较快(倒置相差显微镜×100)

图 1 骨髓基质干细胞形态

2.2 Cbfa 1 活性检测

采用高敏的基于 ELISA 的检测法,观察经不同处理的骨髓基质干细胞核转录因子 Cbfa 1 活性。骨髓基质细胞在传代后第 3 d,实验组与对照组 Cbfa 1 活性差异无显著性。辛伐他汀作用下的实验组在第 6 d 和第 12 d,其活性值较对照组高,而且两者间的差异有显著性,具有统计学意义。

2.3 辛伐他汀对 ALP 比活性影响

实验组传代细胞在辛伐他汀作用后的第 3 d ALP 比活性与对照组间无差异性,在传代的第 6 d

和第 12 d 胞内 ALP 的含量增高,与对照组间的差异有显著性。各组内随培养时间的延长,ALP 含量亦有增高,但是没有差异性。

表 1 Cbfa 1 蛋白的活性(吸光度)

组别	患者数 (例)	第 3 d	第 6 d	第 12 d
对照组	6	0.6120±0.070	0.6505±0.054	0.7327±0.065
Sim(+)	6	0.6132±0.036	0.7532±0.047*	0.9002±0.087*

注:与对照组比较 * P<0.05

表 2 细胞 ALP 比活性的比较(U·g⁻¹·L⁻¹)

组别	患者数 (例)	第 3 d	第 6 d	第 12 d
对照组	6	67.244±6.547	69.883±4.031	77.545±3.135
Sim(+)	6	72.697±5.314	77.847±5.345*	82.710±4.591*

注:与对照组比较 * P<0.05, * P<0.01

2.4 辛伐他汀对 OCN 的影响

实验组在辛伐他汀作用后的第 6、12 d(P<0.05),18 d(P<0.01)OCN 的含量都明显高于对照组,且随时间的延长有逐渐增加的趋势。

表 3 不同时间 OCN 含量的变化(ng/mL)

组别	患者数 (例)	第 6 d	第 12 d	第 18 d
对照组	6	0.3921±0.063	0.6144±0.057	0.7339±0.075
Sim(+)	6	0.4663±0.077	0.7597±0.083*	0.8774±0.075*

注:与对照组比较 * P<0.05, * P<0.01

3 讨论

本实验研究表明:①利用股骨颈骨折患者行股骨头置换术扩髓时抽取骨髓,并且获得松质骨,这样所得的骨髓基质干细胞较多,便于同一个人同一批细胞进行多项指标的检测,有利于获得更加稳定的数据。采用密度梯度离心法分离细胞并诱导 hBMCs 向成骨细胞分化,所获的细胞较多,生长良好;②1×10⁻⁷ mol/L 辛伐他汀能提高 Cbfa1 因子活性;③1×10⁻⁷ mol/L 辛伐他汀能增强 ALP 比活性;④1×10⁻⁷ mol/L 辛伐他汀能增加 OCN 的含量。

骨髓基质干细胞是一种十分理想的种子细胞,在组织工程研究中占有重要的地位。目前,在国外研究人的骨髓基质干细胞多是利用细胞系来研究,而在国内,由于条件限制,多是从自愿患者中抽取骨髓或是利用松质骨来培养。由于常规的全骨髓培养法培养液中有较多的血细胞,影响 hBMCs 的贴壁和生长,本实验采用 percoll 分离液(1.073 g/mL)密度梯度离心法分离出的单个核细胞,其中的骨髓基质干细胞含量较多,原代培养人骨髓基质干细胞约 8~11 d 长满,较全骨髓培养法快。

Cbfa1 作为成骨细胞分化的特异性转录因子,对成骨细胞的生长分化,软骨细胞的成熟发育及牙齿的分化发育具有重要作用^[14]。其缺失突变可引起遗传性骨病。先前实验研究说明,Cbfa 1^{-/-} hBMCs 完全缺乏向成骨细胞分化的能力,但是保留有向脂肪细胞分化的能力^[6,15]。Cbfa 1^{-/-} 突变小鼠出生后很快死于呼吸衰竭,且外观上呈现侏儒症和短肢等改变^[8]。研究还发现 Cbfa 1 的缺失也与一些基因疾病像锁颅骨发育不全或骨肉瘤有关^[7]。Cbfa 1^{-/-} 突变小鼠的胚胎中仅有微弱的 ALP 的表达,几乎不表达骨桥蛋白和骨钙蛋白(骨桥蛋白有一公认的 cbf 结合位点,骨钙蛋白有 3 个结合 cbf 的启动区域)。又因为 ALP 和骨桥蛋白的表达在 OCN 表达之前,且这 3 种蛋白在骨钙化后期都下调,证明 Cbfa 1 的缺失导致成骨细胞成熟的中止发生于分化早期^[8]。研究发现 Cbfa 1 的额外表达导致小鼠的肢体短小,骨量少,成骨细胞矿化能力弱^[16]。因此提示 Cbfa 1 在 hBMCs 成骨分化早期起促进作用,但在晚期则起抑制作用。Maeda 等^[1]发现辛伐他汀的刺激作用在 1×10^{-7} mol/L 时作用时最强。但对于人的 Cbfa 1 因子活性的作用未见报道。通过我们研究发现,在辛伐他汀作用后的第 3 d 其活性未见显著差异。在辛伐他汀作用后的第 6 d 和第 12 d 发现,实验组 Cbfa 1 活性均高于对照组。这更加证实 1×10^{-7} mol/L 的辛伐他汀可以促进 hBMCs 的成骨分化。

ALP 是成骨细胞分化和功能成熟的早期标志,它是成骨细胞矿化过程中主要的功能活性酶,富含于胞浆中,它可分解有机质中磷酸,增加局部无机磷酸浓度,促进矿化,在成骨细胞趋向成熟的转化限制点扮演重要角色。测定成骨细胞内 ALP 活性变化可以了解成骨细胞的分化成熟程度和细胞成骨矿化的能力。ALP 作为成骨细胞的一种特异表型,其活性越高,说明前成骨细胞向成熟成骨细胞分化越明显。ALP 活性与收获的细胞有关,而 ALP 活性与蛋白浓度的比值,即比活性,更能准确反映成骨分化。同时,ALP 是一种分泌型蛋白,主要作用是在细胞外基质中通过水解磷酸酯,提供骨盐,有利于成骨。OCN 是成骨细胞分化成熟的标志,被认为在维持正常骨钙化率和抑制软骨钙化中起重要作用。本实验结果显示:在辛伐他汀作用后的第 6、12、18 d 中,实验组较对照组 OCN 含量都增高,差异有显著性。从而进一步说明辛伐他汀对 hBMCs 分化有促进作用^[17]。

在临床的回顾性研究中也发现,服用辛伐他汀

可以增加血清中 OCN 的水平^[18],而且可以有效降低股骨颈骨折的发病率^[19,20]。综上所述,辛伐他汀能通过增加 hBMCs 定向分化成成骨细胞中 Cbfa 1 因子活性而增加标志性产物 ALP 比活性和 OCN 产量,从而促进 hBMCs 的分化。但是对于 Cbfa 1 活性调节途径和信号如何转导,及其体内辛伐他汀最佳作用浓度以及选择最佳体内成骨能力的合适时机等问题,仍有待于进一步的研究。

【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] Jadhav SB, Jain GK. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. *Pharm Pharmacol*, 2006, 58(1):3-18.
- [3] Choudhury NG, Mandal CC, Ghosh G. Choudhury Statin-induced Ras Activation Integrates the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signal to Akt and MAPK for Bone Morphogenetic Protein-2 Expression in Osteoblast Differentiation. *J Biol Chem*, 2007, 282(7):4983-4993.
- [4] Mundy G, Garret R, Harris R, et al. Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by statins. *Science*, 1999, 286:1946-1949.
- [5] Maritz FJ, Conradie MM, et al. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21:1636-1641.
- [6] Drissi H, Luc Q, Shakoori R, et al. Transcriptional autoregulation of the bone related CBFA1/RUNX2 gene. *J Cell Physiol*, 2000, 184:341-350.
- [7] Komori T. Requisite roles of Runx2 and cbfb in skeletal development. *J Bone Miner Metab*, 2003, 21:193-197.
- [8] Ducy P, Zhang R, et al. Osf2/Cbfa 1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 1997, 89:747-754.
- [9] Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 1997, 89:755-764.
- [10] Harada H, Tagashira S, et al. Cbfa 1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Bio Chem*, 1999, 274:6972-6978.
- [11] Xiao G, Jiang D, Thomas P, et al. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, cbfa1. *J Bio Chem*, 2000, 275:4453-4459.
- [12] Chunxi Ge, Guozhi Xiao, Di Jiang, et al. Critical role of the extracellular signal-regulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development. *J Cell Biol*, 2007, 176:709-718.
- [13] Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 2000, 289:1501-1504.
- [14] Hiroko Kojima, Toshimasa Uemura. Strong and Rapid Induction of Osteoblast Differentiation by Cbfa 1/Til-1 Overexpression for Bone Regeneration. *J Bio Chem*, 2005, 280(4):2944-2953.

(下转第 380 页)

(上接第 384 页)

- [15] Lin Lin, Lianxu Chen, Haijun Wang, et al. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against Runx2/Cbfa 1 inhibits the formation of heterotopic ossification in animal model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 349:564-572.
- [16] Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, et al. Overexpression of Cbfa 1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol*, 2001, 155:157-166.
- [17] Ranjoo Hwang, Eun Jin Lee, Myoung Hee Kim, et al. Calcyclin, a Ca^{2+} Ion-binding Protein, Contributes to the Anabolic Effects of

Simvastatin on Bone. *J Bio Chem*, 2004, 279(20):21239-21247.

- [18] Chan MH, Mak TW, Chiu RW, et al. Simvastatin increases serum osteocalcin concentration in patients treated for hypercholesterolaemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86:4556-4559.
- [19] Meier CR, Schlienger RG, Kraenzlin ME, et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of fractures. *JAMA*, 2000, 283:3205-3210.
- [20] Chan KA, Andrade SE, Boles M, et al. Inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and risk of fracture among older women. *Lancet*, 2000, 355:2185-2188.

(收稿日期: 2006-12-07)