

辛伐他汀对大鼠骨量及骨髓基质干细胞增殖、分化的影响

田发明 张柳 孟亚强 郑杰 蔡俊 韩大成 曲强

摘要：目的 观察辛伐他汀体内给药对大鼠骨量和骨髓基质干细胞增殖、分化的影响。方法 16 只 9 周龄雌性 SD 大鼠按体重随机分成 2 组，每组 8 只 第 1 组(G1)，对照组，每天蒸馏水灌胃(N) 第 2 组(G2)，实验组，辛伐他汀灌胃 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (S_{20})，持续 3 周，于最后 1 次灌胃的第 2 天处死所有大鼠，取右侧股骨行骨密度和骨组织形态计量学测定 取左侧股骨和胫骨骨髓细胞分别向成骨、成脂方向诱导培养，并作如下检测：(1)成骨组 采用 Cell Counting Kit-8(CCK-8)法检测定向成骨分化中的骨髓基质干细胞的增殖能力 细胞培养第 16 d 和 28 d 分别检测碱性磷酸酶(ALP)比活性、ALP 染色和 von Kossa 染色；细胞培养第 16 d，提取总 RNA，采用 Real-time RT-PCR 检测骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、碱性磷酸酶(ALP)、破骨细胞分化因子(RANKL)mRNA 的表达；(2)成脂组 采用 CCK-8 法检测定向成脂分化中的骨髓基质干细胞的增殖能力 细胞培养第 18 d，检测 LPL 比活性，并提取总 RNA，采用 Real-time RT-PCR 检测脂蛋白脂酶(LPL)mRNA 的表达。结果 辛伐他汀体内给药干扰 21 d 后大鼠骨量和骨密度无显著变化。体外培养骨髓基质干细胞所有检测基因 mRNA 水平、细胞增殖能力、矿化能力(von Kossa 染色)、ALP 比活性、ALP 染色、LPL 比活性两组间差异均无显著性。结论 辛伐他汀体内给药 3 周对大鼠骨量及骨髓基质干细胞的增殖和分化无显著作用。

关键词：辛伐他汀；骨组织形态计量学；骨密度；骨髓基质干细胞；Real-time PCR

Effects of simvastatin on bone mass and the proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells in rats TIAN Faming, ZHANG Liu, MENG Yaqiang, et al. Department of Orthopaedic Surgery, North China Coal Medical College, Affiliated Hospital, Hebei, Tangshan 063000, China

Abstract : **Objective** To investigate the effects of simvastatin on bone mass and differentiation and proliferation of the cultured bone marrow stromal cells(BMSC) in rats. **Methods** Sixteen 9-week-old female Sprague-Dawley rats were randomized into two groups of eight animals each: G1, control group with Vehicle for three weeks; G2, administered daily with $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of simvastatin by gavage for three weeks. All animals were sacrificed one day after the final administration. The right femora were removed for the measurement of bone histomorphometry and bone mineral density (BMD). BMSC were derived from the left femora and tibiae. The cells were divided into two groups for differentiation into osteoblast (group A, GA) and adipocyte (group B, GB) separately. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to assay the proliferation of BMSC. For group A, alkaline phosphatase (ALP) activity, ALP staining were performed on the 16th d and von Kossa staining on the 28th d. Real-time RT-PCR was used to evaluate the expression level of mRNA of BMP-2, ALP, RANKL on the 16th d. For group B, lipoprotein lipase (LPL) activity and expression level of mRNA of LPL were detected on the 18th d. **Results** After being administrated with simvastatin for 3 weeks, the bone mass and bone mineral density (BMD) of rats had no significant change between two groups. The expression level of mRNA of BMP-2, ALP, RANKL and LPL showed no significant change, so were the results of ALP activity, ALP staining, von Kossa staining, LPL activity and the proliferation of BMSC. **Conclusion** Administrated with simvastatin for three weeks has no significant effect on bone

基金项目：河北省自然科学基金资助项目(C2006000580)

作者单位：063000 唐山，华北煤炭医学院附属医院骨外科(田发明、张柳、孟亚强、郑杰、蔡俊、韩大成) 中国协和医科大学北京协和医院基本外科(曲强)

通讯作者：张柳，Email: zhliu130@sohu.com

mass and the differentiation and proliferation of BMSC in rats.

Key words: Simvastatin; Bone histomorphometry; Bone mineral density; Bone marrow stromal cells; Real-time RT-PCR

1999 年 Mundy 等^[1]发现他汀类药物可增强成骨细胞系的骨形成蛋白-2(BMP-2)的表达,并能有效地刺激骨形成。随后,Pytlík 等^[2]证实辛伐他汀可增加正常及去卵巢大鼠的骨量,Oxlund 等^[3]进一步证实辛伐他汀在促进骨形成增加密质骨骨密度的同时,也抑制松质骨骨量的丢失。临床回顾性研究也表明,服用他汀类药物可以增加血清中骨钙素(osteocalcin, OCN)的水平^[4],并降低骨折的发病率^[5,6]。我们先前的实验也证实辛伐他汀可以部分阻止去卵巢大鼠骨量的丢失,并可以促进体外培养的 BMSC 向成骨细胞分化^[7,8],但 Maritz 等^[9]的实验却发现他汀类药物可降低正常大鼠的骨密度,促进骨转换。本实验在采用骨组织形态计量学进一步验证辛伐他汀对大鼠骨量影响的同时,参照已建立的大鼠 BMSC 体外培养模型^[10]体外培养大鼠 BMSC 探讨辛伐他汀对其增殖与分化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物:清洁以上级 9 周龄雌性 SD 大鼠 16 只,(北京维通利华实验动物养殖中心提供,动物合格证号 SCXK(京)2002-0003 号)体重(265 ± 20)g。

1.1.2 试剂和仪器:DMEM 培养基(Gibco),辛伐他汀(商品名 西之达,国药准字 H 20000007,浙江瑞邦药业有限公司生产),脂蛋白脂酶检测试剂盒、碱性磷酸酶检测试剂盒、考马斯亮蓝试剂盒(南京建成生物制品有限公司),CCK-8(日本协和化学研究所),Trizol(Invitrogen),Line-Gene II 荧光定量 PCR 系统(FQD-66 A,杭州博日),M-MLV 逆转录试剂盒(BBI 公司),Realtime PCR MasterMix(TOYOBO 公司),引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组和给药 所有大鼠均置于 20℃ 左右和自然光照的动物房中饲养 1 周适应环境,根据体重随机分成 2 组(每组 8 只大鼠):第 1 组(G1),对照组,每天用蒸馏水灌胃;第 2 组(G2),实验组,辛伐他汀 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃(S_{20}),持续 3 周。每周称体重 2 次,根据体重计算新的给药量。处死前 11 d、4 d 分别皮下注射盐酸四环素 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和钙黄绿素(calcein) $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.2.2 标本采集与处理 所有实验动物于最后 1 次给药第 2 天脱颈致死,在无菌条件下取右侧股骨,4℃ 避光保存在 70% 酒精中,以备测量骨密度和制作硬组织切片,取左侧股骨和胫骨,收集骨髓细胞进行细胞培养。

1.2.3 DEXA 测量骨密度 应用 Norland-XR 36 双能 X 线骨密度测量仪(DEXA,美国),测量股骨骨密度(Bone Mineral Density, BMD)。依据骨密度测量仪实际扫描测量的股骨长度,分别测量整体骨密度(total Bone Mineral Density, tBMD),近端(上 1/4)骨密度(Proximal Bone Mineral Density, pBMD),中段(中 1/2)骨密度(middle Bone Mineral Density, mBMD),远端(下 1/4)骨密度(distal Bone Mineral Density, dBMD)。

1.2.4 骨组织形态计量学骨标本制作和测量方法:

(1)骨组织不脱钙制片 处死大鼠后截取股骨下端固定于 70% 酒精,经甲基丙烯酸甲酯包埋、不脱钙切片,Von Kossa 及 Giemsa 染色。用 Leica DMLB 2 荧光/光学显微镜及 Leica DC 300 数码摄像系统进行观察与摄取图像。(2)骨计量学测量指标及方法:骨组织形态计量学的动态和静态参数在股骨远端干骺端生长板上 1 mm 至 4 mm 范围内的次级松质骨中测量,分内、中、外 3 点随机选取图像录入微机,每个标本采用两种观察方法,每种 9 个图像(组织学观察用 Giemsa 染色、普通光源;类骨质观察用 von Kossa 染色),然后采用 Leica QWin 多功能彩色病理图像分析软件进行骨组织形态计量学参数测定。

1.2.5 骨髓基质干细胞的体外培养 脱颈处死大鼠并于无菌条件下取其左侧股骨和胫骨,去除附着肌肉和结缔组织。用完全 DMEM 培养液(青霉素 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,链霉素 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 胎牛血清,)反复冲洗骨髓腔,收集细胞于离心管中,1000 r/min 离心 10 min,弃上清,细胞重悬后反复吹打成单细胞悬液,接种于培养瓶中(2 瓶/只), $50 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ (体积分数)二氧化碳,37℃ 温箱中培养。24 h 后换液,以后每 2~3 d 更换培养液,弃掉未贴壁的悬浮细胞。细胞大致融汇至 80% 后加入条件培养基,分别向成骨细胞(维生素 C $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, β -甘油磷酸钠 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和脂肪细胞(吡哆美辛 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、氢化可的松 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)诱导分化,细胞融汇成致密单层后消化、计数并分别接种于培养瓶、96、12、6 孔

板和 35 mm 培养皿中。

1.2.6 细胞增殖的测定 第 1 代细胞以 $5 \times 10^3/\text{mL}$ 密度接种于 96 孔培养板, 每组 100 孔, 每孔培养基总量为 100 μL , 次日起每天每组选择 20 孔细胞, CCK-8 法连续测 5 d。计算当天(第 1 天除外)所测吸光度值与前 1 天所测吸光度值的比值。

1.2.7 Real-time RT-PCR 骨髓基质干细胞在体外诱导培养 16 d(成骨组) 和 18 d(成脂组) 后, 采用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA, RNA 定量后反转录合成第一链 cDNA 后, 用 LINE-GENE II 荧光定量 PCR 系统(FQD-66 A, 杭州博日) 进行 PCR 反应, 内参基因(GAPDH) 与待测基因同批扩增, 梯度稀释内参基因法制定相对标准曲线, 根据扩增产物的 Ct 值(扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增循环次数) 及相对标准曲线求出各标本所含该基因的模板量, 并与其内参量作比, 采用溶解曲线法和凝胶电泳法鉴定产物特异性和片段大小。PCR 反应体系: 总体积 50 μL , 包括: Realtime PCR MasterMix 25 μL , 引物($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 2 μL , cDNA 模板 5 μL 。PCR 反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40 个循环。成脂组检测 LPL, 其余为成骨组检测基因。引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列

基因	Primers	产物长度(bp)
GAPDH	sense 5'-GGATCTGACATGCCCGCTGGAG-3', antisense 5'-GGTGAAGAATGGGAGTTGCTGTTG-3'	154
BMP-2	sense 5'-AAGGCACCCCTTTGTAGTGTGTGG-3', antisense 5'-CATGCCTTAGGGATTTTGA-3	189
ALP	sense 5'-GAGCAGGAACAGAAAGTTTGC-3', antisense 5'-GTTGCAGGCTCTGGAGAGTA-3'	202
RANKL	sense 5'-CCATCGGGTTCCCATAAAGTCAGT-3', Antisense 5'-AAAGCCCCAAAGTACGTCGCATCT-3'	407
LPL	sense 5'-TCCAGAAACCACTAGGGCATG-3', antisense 5'-GGAAAGTGCCTCCATIGGG-3'	51

1.2.8 细胞 ALP 比活性测定 成骨诱导组细胞培养第 16 d, 12 孔板中的细胞消化、离心收集并裂解细胞, 取上清用碱性磷酸酶试剂盒检测细胞 ALP 活性, 考马斯亮兰测定盒行蛋白定量。用 ALP 活性数值比蛋白量, 得到细胞 ALP 比活性数值。

1.2.9 ALP 染色 成骨组细胞诱导培养第 16 d, 取预置有盖玻片的 12 孔板, PBS 冲洗, 采用磷酸萘酚 AS-MX, 固定 TR 法, 作碱性磷酸酶染色, 细胞核染为红棕色, ALP 阳性细胞胞浆为蓝色(具体步骤参照试剂盒说明书)。

1.2.10 von Kossa 染色 成骨诱导组细胞培养第 28

天, 取已接种细胞的 35 mm 培养皿 PBS 液冲洗, 4% 多聚甲醛固定 5 min, 加入 5% 硝酸银溶液, 开盖在紫外灯下 1 h, 加入 5% 硫代硫酸钠溶液中和残留的硝酸银溶液, 室温晾干, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.11 LPL 比活性 成脂诱导组细胞培养 18 d, 收集 12 孔板中的细胞裂解, 取上清(方法同 ALP 比活性测定) 用脂蛋白脂酶试剂盒检测细胞 LPL 活性, 考马斯亮兰测定盒定量蛋白。用 LPL 活性值比蛋白量, 得到细胞 LPL 比活性。

1.3 统计学处理

实验数据以均值 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 骨密度测量结果

两组间各段骨密度差异均无显著性, $P > 0.05$, 见表 2。

表 2 骨密度测量结果

组别	tBMD(g/cm^2)	pBMD(g/cm^2)	dBMD(g/cm^2)	mBMD(g/cm^2)
N($n=8$)	0.1273 $\pm$ 0.0035	0.1285 $\pm$ 0.0082	0.1215 $\pm$ 0.0057	0.1482 $\pm$ 0.0101
S20($n=8$)	0.1297 $\pm$ 0.0083	0.1359 $\pm$ 0.0083	0.1200 $\pm$ 0.0118	0.1512 $\pm$ 0.0109

2.2 骨组织形态计量学结果

两组间所有的静态参数与动态参数差异均无显著性, $P > 0.05$, 见表 3。

表 3 骨组织形态计量学结果

项目	N($n=8$)	S ₂₀ ($n=8$)
BV/TV (%)	39.04 $\pm$ 3.82	37.43 $\pm$ 7.21
Tb. Th (μm)	91.89 $\pm$ 10.93	90.24 $\pm$ 18.80
Tb. N (#/mm)	11.00 $\pm$ 1.23	11.51 $\pm$ 2.50
Tb. Sp (μm)	143.83 $\pm$ 16.14	150.88 $\pm$ 20.76
%L. Pm (%)	8.20 $\pm$ 1.88	8.87 $\pm$ 2.01
BFR/BS ($\mu\text{m}/\text{d} \times 100$)	8.17 $\pm$ 1.36	8.51 $\pm$ 1.28
BFR/BV (%/year)	47.33 $\pm$ 9.56	52.38 $\pm$ 13.07
MAR ($\mu\text{m}/\text{d}$)	1.09 $\pm$ 0.13	1.12 $\pm$ 0.14
Er. Pm (%)	1.95 $\pm$ 0.76	2.16 $\pm$ 0.72
O. Pm (%)	2.16 $\pm$ 0.49	2.24 $\pm$ 0.53
Oc. N (#/mm ²)	1.02 $\pm$ 0.54	1.46 $\pm$ 0.56

2.3 细胞培养形态观察结果

骨髓细胞接种初期可见大量悬浮细胞, 而沉淀细胞中可见到体积较大的单核细胞, 24 h 后可见少数细胞伸角变形。随培养时间延长, 未贴壁的悬浮细胞死亡或随细胞液丢弃, 贴壁的骨髓基质细胞呈典型梭形或多角形的成纤维细胞样生长。细胞培养 7~8 d, 融汇至 80% 左右。成骨组细胞随传代生长逐渐变大并变形为三角形或多边形, 随胶原积累和钙盐沉积而出现矿化小结; 成脂组细胞生长相对较

慢,胞浆可见折光性强的脂滴并逐渐增多。

2.4 细胞增殖能力检测结果

原代细胞传代接种于 96 孔板后 2 到 3 天增殖

最为显著,以后逐渐减慢,成骨组细胞和成脂组细胞增殖能力两组间差异均无显著性 ($P > 0.05$),见图 1。

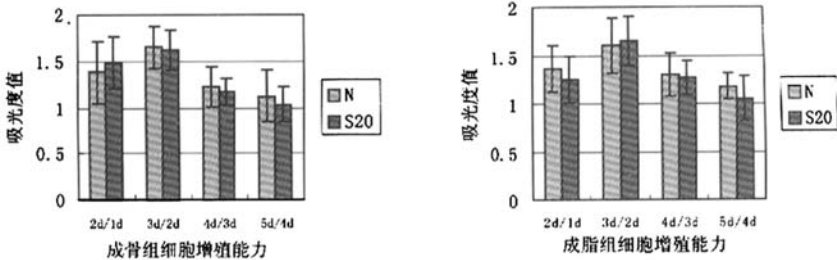


图 1 细胞增殖能力检测结果

2.5 Real time RT-PCR 结果

两组间检测基因 ALP、BMP-2、RANKL、LPL mRNA 的表达水平差异均无显著性 ($P > 0.05$),见图 2。

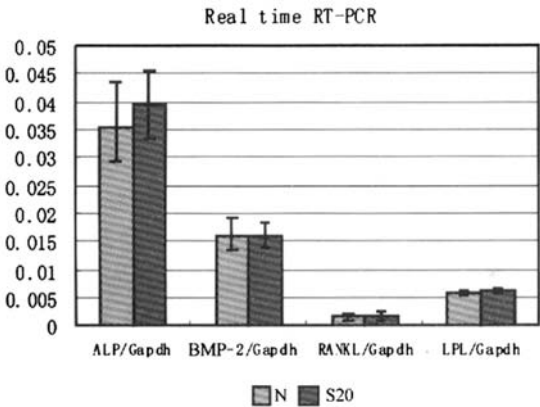


图 2 ALP、BMP-2、RANKL、LPL 的 mRNA 表达水平

2.6 ALP、LPL 比活性

成骨组细胞培养第 16 天和成脂组细胞培养第 18 天分别检测 ALP 和 LPL 比活性,两组间差异无显著性 ($P > 0.05$),见表 4。

表 4 ALP 和 LPL 比活性检测结果

Group	N (n = 8)	S ₂₀ (n = 8)
ALP activity (U/gprot)	64.05 ± 11.32	68.72 ± 10.98
LPL activity (U/gprot)	2.27 ± 0.66	2.56 ± 0.51

2.7 ALP 染色 细胞培养第 16 天,两组 ALP 染色阳性细胞(胞浆蓝黑色)比例均在 30% 左右 (N 30.28 ± 0.12 , S $20 30.31 \pm 0.09$) 差异无显著性 ($P > 0.05$),见图 3。

2.8 Von Kossa 染色

成骨组细胞培养至 28 天,经 von Kossa 染色可发现大小不等染为黑色的钙化点,两组间差异无显著性,见图 4。

3 讨论

本实验研究发现用 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 辛伐他汀口服给药 3 周,不能显著影响大鼠骨量以及体外培养的 BMSC 的增殖与分化,表现在:两组间大鼠股骨各段骨密度差异均无显著性,股骨远端骨组织形态计量学观察差异亦无显著性,骨形成和骨吸收的参数都较低,骨转换不活跃,骨量稳定;体外诱导培养的大鼠 BMSC 的增殖能力两组间差异无显著性;BMP-

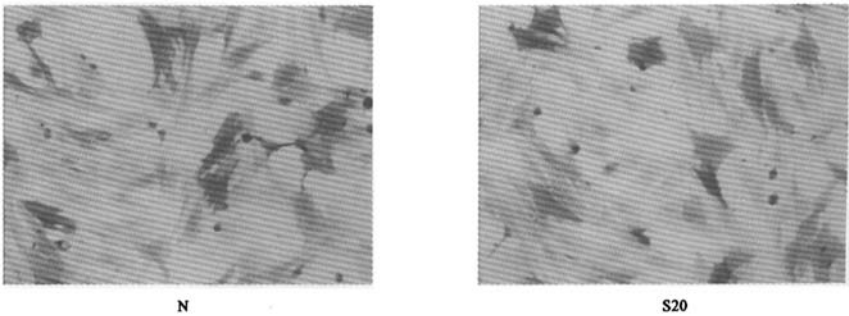


图 3 ALP 染色结果 ($\times 100$)

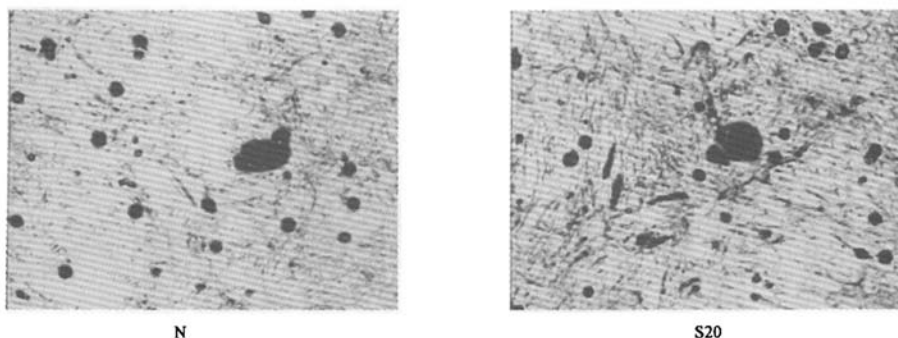


图 4 Von Kossa 染色结果 ($\times 100$)

2、ALP、RANKL、LPL mRNA 的表达水平两组间差异无显著性, ALP 比活性、LPL 比活性、矿化能力 (von Kossa 染色) 两组间差异亦无显著性。

骨髓基质干细胞具有多向分化潜能, 如何能有效刺激骨髓基质细胞 (BMSC) 向成骨细胞分化, 和 (或) 抑制其向其他方向分化, 在骨组织工程学和骨质疏松治疗学方面, 具有重要价值。骨形态发生蛋白 2 (BMP-2) 属于 TGF- β 超家族成员, 不仅可以促进成骨细胞及其前体细胞的增殖, 而且能够促进成骨细胞的分化, 碱性磷酸酶 (ALP) 在成骨细胞分化过程中活性特异性增高, 也是成骨细胞分化的一项重要指标, 破骨细胞分化因子 (RANKL) 由成骨细胞分泌, 可促进破骨细胞的分化, 脂蛋白脂酶 (LPL) 则是脂肪细胞分化的特异性标志之一。目前除关于辛伐他汀促进成骨分化的报道外, 另有实验发现辛伐他汀可抑制破骨细胞或脂肪细胞的分化^[10,11]。而在本实验中, 两组间以上所有基因的 mRNA 水平差异均无显著性, ALP 比活性、LPL 比活性和矿化小结的检测结果与此一致。而我们用 CCK-8 法检测定向诱导分化中的骨髓基质干细胞的增殖能力也没有发现组间差异, 因此我们未能发现短期口服辛伐他汀对大鼠骨髓基质干细胞的增殖和分化的影响, 虽然我们在先前的实验中证实两种剂量 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 给药 4 周) 辛伐他汀可部分阻止去卵巢大鼠骨量的丢失^[7,8], 但本实验以正常大鼠为研究对象, 且给药周期更短。

目前国内外大多实验研究肯定了辛伐他汀的成骨潜能^[3-5,7,8,10,12], 但也有部分实验得出不同结论, Sonobe 等^[13]在以地塞米松 ($10 \sim 8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 为阳性对照的前提下, 同时检测 3 种相同剂量他汀类药物 (氟伐他汀、辛伐他汀、普伐他汀) 对体外培养大鼠 BMSC 的作用并发现, 3 种他汀类药物均不能显著增

强基质矿化、ALP 活性及 OCN 的表达, Maritz 等^[9]的实验更加细致地分析了口服 12 周 3 种他汀类药物及不同剂量的辛伐他汀对正常和去卵巢大鼠骨密度及骨量的影响, 结果发现他汀类药物降低鼠的骨密度, 高剂量 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 的辛伐他汀同时刺激骨形成和骨吸收, 而在去卵巢大鼠则无类似发现, 辛伐他汀对骨转换和骨代谢确实有刺激作用, 但不能阻止去卵巢大鼠骨量的丢失。Stechow 等^[14]的实验同样对辛伐他汀体内给药能否刺激骨形成提出了质疑, 在对小鼠行去卵巢术后 5 周口服辛伐他汀 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 8 周后发现, 辛伐他汀既不能促进骨形成, 亦不能增强成骨细胞活性。不可否认的是, 口服辛伐他汀经代谢后到达骨组织的药物浓度太低, 作用较弱, 这也是目前动物实验结论不一致的原因之一, 尤其是短期应用或治疗而不是预防骨质疏松^[14], 要明确辛伐他汀对骨代谢的影响尚须进一步探讨最佳的给药方式和时间, Ayukawa 等^[15]研究发现腹膜下给予辛伐他汀 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 可促进植入钛周围骨形成的影响, 在兔的顶骨缺损处植入含有辛伐他汀的胶原移植体可诱导骨形成^[16]。

总之, 我们的实验发现短期口服辛伐他汀对大鼠骨量和骨髓基质干细胞的增殖和分化没有显著影响, 辛伐他汀的成骨潜能有待进一步证实。

【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] Pytlík M, Janiec W, Misiarz-Myrta M, et al. Effects of simvastatin on the development of osteopenia caused by ovariectomy in rats. *Pol J Pharmacol*, 2003, 55(1): 63-71.
- [3] Oxlund H, Andreassen TT. Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone loss while increasing cortical bone formation. *Bone*, 2004, 34: 609-618.

- [4] 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.
- [5] Meier CR, Schlienger RG, Kraenzlin ME, et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of fractures. *JAMA*, 2000, 283 : 3205-3210.
- [6] Schoofs MW, Sturkenboom MC, Van Der Klift M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of vertebral fracture. *J Bone Miner Res*, 2004, 19 : 1525-1530.
- [7] Zheng J, Zhang L, Yao SS. Simvastatin on osteoblastic differentiation in bone marrow stromal cells of rats by simvastatin administration. *Chin J Osteoporos*, 2006, 12(3) : 278-282. (in Chinese)
- [8] Yao SS, Zhang L, Zheng J. Effect of simvastatin on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells in rats. *J Fourth MilMed Univ*, 2006, 27(17) : 1609-1612. (in Chinese)
- [9] Maritz FJ, Conradie MM, Hulley PA, et al. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21 : 1636-1641.
- [10] Song CL, Guo ZQ, Ma QJ, et al. Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bonemarrow stromal cells. *Biochem Biopsy Res Common*, 2003, 308 : 458-462.
- [11] Liu B, Yu SF, Pang SZ. Effect of simvastatin on the osteoclastic resorption and bone anabolism with murine calvarial organ culture *in vitro*. *Chin J Osteoporos*, 2005, 11(3) : 351-355. (in Chinese)
- [12] Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, et al. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 280 : 874-877.
- [13] Sonobe M, Hattori K, Tomita N, et al. Stimulatory effects of statins on bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Study of a new therapeutic agent for fracture. *Biomed Mater Eng*, 2005, 15 : 261-267.
- [14] Von Stechow D, Fish S, Yahalom D, et al. Does simvastatin stimulate bone formation *in vivo*? *BMC Musculoskelet Disord*, 2003, 4 : 8.
- [15] Ayukawa Y, Okamura A, Koyano K. Simvastatin promotes osteogenesis around titanium implants. A histological and histometrical study In rats. *Clin Oral Impl Res*, 2004, 15 : 346-350.
- [16] Wong RWK, Rabie ABM. Early healing pattern of statin-induced osteogenesis. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2005, 43 : 46-50.