

# 辛伐他汀对成骨样细胞 MC3T3-E1 增殖功能的影响

刘铭 朱振安 汤亭亭

中图分类号: R965; R361.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)02-0101-05

**摘要:**目的 从细胞、蛋白及基因水平探讨辛伐他汀对成骨样细胞 MC3T3-E1 增殖的影响。方法 辛伐他汀选取  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  和  $10^{-9}$  mol/L 4 个浓度组,同时设溶剂对照组。含血清细胞培养条件下,连续细胞计数 8 d,描绘生长曲线;无血清培养条件下,分别于 24、48 及 72 h 进行细胞计数、四唑盐比色试验(MTT)、蛋白质含量测定和 DNA 含量荧光测定。结果 含血清细胞培养条件下,辛伐他汀各浓度组与溶剂对照组的生长曲线相比较,无明显差异;无血清培养条件下,辛伐他汀各浓度组与溶剂对照组 24、48 及 72 h 时细胞计数、MTT 比色试验及 DNA 含量荧光测定各组间未见明显差异;蛋白质含量测定 24 及 72 h 时各组间无明显差异,然而 48 h 时  $10^{-6}$  mol/L 辛伐他汀组蛋白含量明显高于对照组并差异有显著性( $P < 0.05$ )。结论 辛伐他汀促进了成骨样细胞 MC3T3-E1 细胞的蛋白合成功能,但对其增殖无明显影响。

**关键词:** 辛伐他汀; MC3T3-E1; 成骨样细胞; 细胞增殖

**The effect of simvastatin on the osteoblast-MC3T3-E1 proliferation** LIU Ming, ZHU Zhen'an, TANG Tingting. Department of Orthopaedic Surgery, The 9th Hospital of the Medical College of Jiaotong University, Shanghai 200011, China

**Abstract:** **Objective** To study the effect of simvastatin on the osteoblast-MC3T3-E1 proliferation from the levels of cell, protein and gene. **Method** Five test groups included simvastatin groups ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  mol/L) and vehil control group. Under cell culcure with serum, cell growth curves for 8 days was drawn; Under cell culcure without serum, cell count, MTT test, DNA content and protein quantity within 24 hs, 48 hs and 72 hs were tested. **Result** There are no significant differences between simvastin groups and control group in growth curves, cell count, MTT test and DNA content. Protein content of  $10^{-6}$  M simvastatin group was significantly higher in the 48th hours of cell culture without serum, compared with control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Simvastatin increased the protein content of MC3T3-E1, but didn't affect the cell proliferation.

**Key words:** Simvastatin; MC3T3-E1; Osteoblast; Proliferation

他汀类药物原是一种广泛应用于临床的降血脂药物,属于 3-羟基 3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂<sup>[1]</sup>。Mundy 等<sup>[2]</sup>于 1999 年首次报道了他汀类药物(辛伐他汀等)具有促进骨代谢合成的生物学作用,自此他汀类药物一跃成为骨形成促进药物研发的新兴热点。目前市场上销售量最大,临床中应用最广泛的是辛伐他汀,因此我们选取辛伐他汀作为研究对象,具有突出的现实意义。骨质疏松症是以骨密度降低,骨结构微损伤,骨脆性增加,从

而易发骨折为特征,主要分为绝经后骨质疏松(I型)和老年性骨质疏松(II型)。I型骨质疏松表现为骨转换增高,破骨细胞的骨吸收能力超过成骨细胞的骨形成能力即成骨功能相对不足;II型骨质疏松亦称增龄性骨质疏松,与成骨细胞分裂增殖减缓,数量减少,成骨功能下降有关。两型骨质疏松皆与成骨细胞的数量及功能下降有关。若能够促进成骨细胞的增殖,增加细胞的数量,亦间接弥补了细胞功能上的不足,无论对于 I 型或 II 型骨质疏松都能达到防治的目的。因此,探讨辛伐他汀能否促进成骨细胞增殖具有重要意义。本研究将从细胞、基因及蛋白等水平探讨辛伐他汀对成骨样细胞 MC3T3-E1

增殖的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞来源:永生细胞系:MC3T3-E1(北大医学院细胞库)。

1.1.2 试剂及仪器:辛伐他汀(Calbiochem, Germany), DMEM培养基(GIBICO, USA), 胎牛血清(HYCLONE, USA), 青链霉素双抗(HYCLONE, USA), DMSO(Sigma, USA), Bradford蛋白质含量测定试剂盒(碧云天生物技术研究所, 江苏), MTT粉(Sigma, USA), 荧光染料Hoechst 33258(Sigma, USA), 酶标仪(Bio-TEK, Synergy HT, USA)。

### 1.2 方法

1.2.1 含血清细胞培养:MC3T3-E1细胞以DMEM完全培养基(10%胎牛血清, 100 U/mL青霉素和100  $\mu$ g/mL链霉素)在CO<sub>2</sub>浓度5%, 湿度95%, 恒温37℃的二氧化碳培养箱中培养。3 d换液1次, 5~6 d细胞基本融合后传代(图1), 更换为含不同浓度辛伐他汀( $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 和 $10^{-9}$  mol/L)的条件培养组和仅含溶剂DMSO的条件培养组, 共计5组。

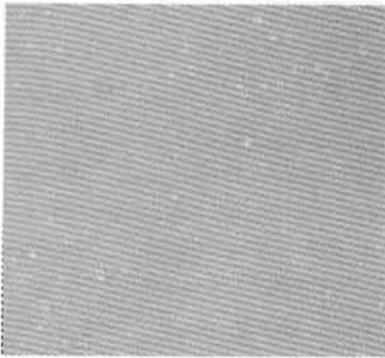


图1 培养细胞

生长曲线测定:消化细胞,制成单细胞悬液,接种至24孔板内,  $9 \times 10^3$  cells/孔, 每组3孔。每日计数1组, 计数8 d, 描记生长曲线。

1.2.2 无血清细胞培养:24孔板( $9 \times 10^3$  cells/孔), 96孔板( $1.5 \times 10^3$  cells/孔), 每组3孔, DMEM完全培养液, 细胞融合近80%时改为含不同浓度的辛伐他汀( $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 和 $10^{-9}$  mol/L)药物的无血清培养(设溶剂对照组), 分别于24、48及72 h进行:细胞计数, 四唑盐比色试验(MTT), 蛋白质含量测定(Bradford)和DNA含量荧光测定。①细胞计数:消化细胞, 制备单细胞悬液, 用10×物镜观察血球计

数板四角大方格中的细胞数:(4大格细胞数之和/4)  $\times 10^4$  = 细胞数/毫升原液。②MTT比色试验:96孔板接种细胞, 每组3孔, 每孔体积200  $\mu$ L, 各加入MTT液(5 mg/mL)20  $\mu$ L, 37℃孵育4 h, 终止培养, 吸弃孔内上清, 加入150  $\mu$ L DMSO, 振荡10 min, 选择490 nm波长, 酶标仪上测定各孔吸光值。吸光值大小与细胞数量正相关。③DNA含量荧光测定:24孔板接种细胞, 每组消化3孔细胞检测DNA含量。荧光染料Hoechst 33258以DPBS缓冲液配成0.1  $\mu$ g/mL分析液;96孔板每孔上样40  $\mu$ L, 每组3孔, 同时设标准孔;每孔加入160  $\mu$ L分析液, 室温放置3~5 min;酶标仪选择激发波长360 nm, 发射波长465 nm, 测定荧光强度。④蛋白质含量测定(Bradford):24孔板接种细胞, 每组消化3孔细胞检测蛋白含量。吸去培养液, 50 mmol/L的Tris缓冲盐水(TBS, pH7.4)冲洗1次;50 mmol/L的Tris液(pH7.4)3 mL/皿, 刮下细胞;超声细胞粉碎机粉碎, 工作时间3 s, 间隔2 s, 功率300 W, 工作次数30次;96孔板每孔上样20  $\mu$ L, 每组3孔, 同时设标准孔;每孔加入200  $\mu$ L G250染色液(考马斯亮蓝), 37℃避光放置20 min;酶标仪测定波长590 nm的吸光值。

## 2 结果

### 2.1 生长曲线

细胞经历大约48 h的潜伏期后, 进入对数增长期, 辛伐他汀 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 和 $10^{-9}$  mol/L各组间与溶剂对照组相比, 第1~6天对MC3T3-E1细胞生长能力的影响未见明显差异, 第7~8天时随药物浓度的下降细胞数量略有所增加, 但也无明显差异(图2)。

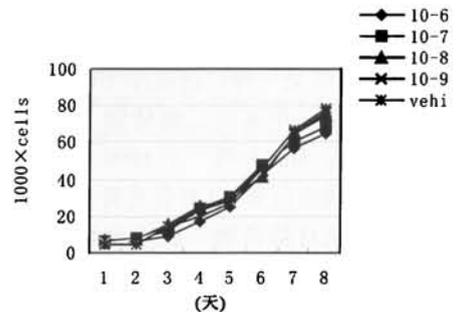


图2 生长曲线

### 2.2 细胞计数、MTT比色试验及DNA含量荧光测定

细胞融合近80%时, 更换培养液为含不同浓度

辛伐他汀( $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 和 $10^{-9}$  mol/L)药物的无血清培养(设溶剂对照组),24、48及72 h时细胞计数、MTT比色试验及DNA含量荧光测定虽然各组数值随时间梯次增加,但各组间未见明显差异(图3~5)。

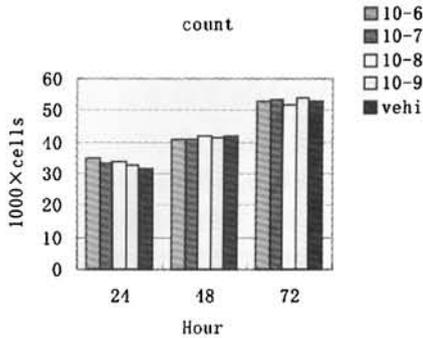


图3 细胞计数

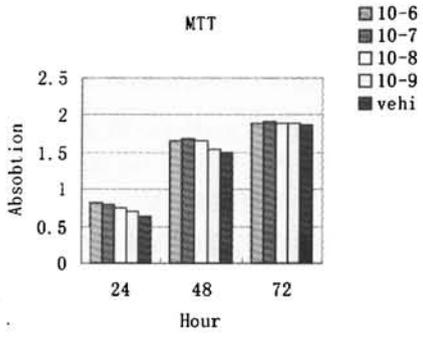


图4 MTT比色试验

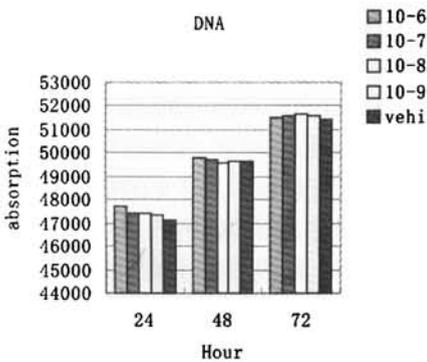


图5 DNA含量

### 2.3 蛋白质含量测定(Bradford)

24、48及72 h各组蛋白总含量梯次增加;24 h时各组间蛋白含量未见明显差异;48 h时辛伐他汀组蛋白含量高于对照组,其中 $10^{-6}$  mol/L辛伐他汀组蛋白含量明显高于对照组并差异显著( $P < 0.05$ );72 h辛伐他汀药物组蛋白含量虽高于对照组,但无明显差异(图6)。

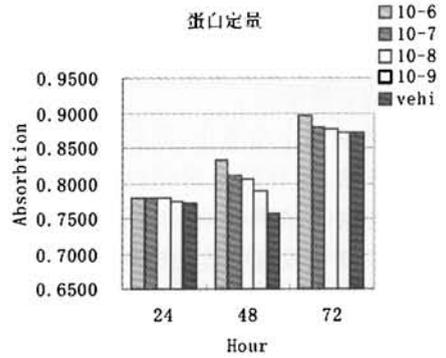


图6 蛋白质含量

注: \*  $P < 0.05$

## 3 讨论

### 3.1 细胞系的选取

MC3T3-E1细胞系是从小鼠下颌骨中逐步培养,筛选纯化的成纤维样永生细胞系<sup>[3]</sup>,具有增殖稳定,可无限传代的特点。原代培养细胞取材于活体组织,更接近体内的自然状况,但易受取材条件和培养环境等多种因素的干扰,虽然对细胞在基因水平上的表达特性影响不大,但就增殖能力而言,不同批次取得的原代细胞往往无法保持稳定性。因此,有关增殖能力的研究一般选取细胞系为研究对象。

此外,无论是老年性骨质疏松还是绝经后骨质疏松,都存在成骨细胞数量相对不足或功能下降的情况,如若能够直接促进成骨细胞的增殖能力,则既可以增加细胞的绝对数量又可以间接的提高细胞的总体功能,从而增强了成骨能力,改善了骨代谢平衡。而MC3T3-E1细胞则属于前成骨细胞系<sup>[4]</sup>,能够分泌骨钙素、骨涎蛋白及具有甲状旁腺素受体,能够近似的反映成骨细胞的特性。因此,本研究选取了MC3T3-E1细胞系来探讨辛伐他汀对细胞增殖能力的影响。

### 3.2 细胞增殖检测方法的评价及结果分析

本研究通过有血清培养和无血清培养两种方式探讨辛伐他汀对细胞增殖能力的影响。在含血清培养条件下,细胞可以持续生长,允许在较长时间内观察细胞的增殖情况,然而血清内含有多种生长因子,这些因子本身即具有促进细胞生长的作用,因此会降低检测细胞增殖能力试验方法的敏感性。无血清培养时,虽然只能在短期内观察细胞的生长状况,但因排除了血清中多种生长因子的干扰,提高了试验方法的敏感度。此外,无血清培养还可以使细胞同步化<sup>[5]</sup>,即使细胞共同进入生长分裂周期的同一阶段,此时细胞在结构和机能上皆处于相似阶段,对

外来刺激的反映更加敏感,更有利于进行各种细胞动力学检测。因此,本研究主要在无血清培养条件下检测细胞的增殖能力。

在含血清的完全培养中,我们选择了描绘生长曲线的试验方法,旨在较长时间内对细胞的生长规律进行连续观察。结果表明,不同浓度的辛伐他汀对细胞的生长变化没有明显的影响。

在无血清培养中,我们选取了细胞计数、MTT比色试验、DNA含量荧光测定及蛋白质含量测定4种方法,从细胞水平、基因水平和蛋白水平来检测辛伐他汀对细胞增殖能力的影响。细胞计数法即应用血球计数板查读细胞的数量,简单实用,是测定药物等物质生物学作用的常用手段;MTT[3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑盐]比色试验主要用于定量分析活细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶反应。这种酶并不堆积在细胞内,而是分泌到细胞外并附着在细胞膜的表面,且不分布到培养液中。其理论基础是琥珀酸脱氢酶能够使外源的MTT还原为难溶的蓝紫色结晶甲臞(Formazan)并沉积在细胞表面,Formazan的生成量与细胞释放出的酶的活性成正比,而酶的活性则与细胞数及细胞活力成正比,从而反映活细胞的数量。此方法灵敏度高、重复性好、操作简便,因此其在细胞增殖、分化以及与细胞生长代谢有关的实验中有非常广泛的应用<sup>[6-8]</sup>;DNA含量测定通常采用荧光法,荧光染料Hoechst 33258能与DNA特异结合,其荧光强度与DNA含量正相关,而DNA含量对于同一种细胞而言是恒定的,其总量的大小只与细胞数量的多少有关,因而可准确的反映细胞的生长状况,此方法与MTT比色试验有着良好的相关性。上述3项试验结果皆表明,辛伐他汀对MC3T3-E1细胞的增殖没有明显的影响。

细胞总蛋白含量测定是从细胞分泌功能上反映细胞的生长状况,但此方法的前提是药物等物质对细胞的生物作用不能影响细胞的功能状态,否则蛋白含量的增多受细胞数量和功能状态两方面的影响,而无法与细胞的数量成比例。因此,该方法都与上述增值检测方法联合应用,不但可测定细胞的生长状况,同时亦可反映细胞的蛋白分泌功能状态。Maeda T等<sup>[9,10]</sup>评价了他汀类药物对前成骨细胞系(MC3T3-E1)的作用,发现辛伐他汀(simvastatin)呈时间-剂量依赖性促进了胞外矿化及碱性磷酸酶(ALP)活性,可促进VEGF、胶原酶消化蛋白及非胶原蛋白的胞外积聚,认为他汀类药物具有促进骨的合成代谢作用。本试验结果与上述结论较为符合:

48 h时辛伐他汀组蛋白含量高于对照组,其中 $10^{-6}$  mol/L辛伐他汀组蛋白含量明显高于对照组,差异显著;24 h时各组间蛋白含量未见明显差异;72 h时辛伐他汀组蛋白含量虽高于对照组,但未见明显差异。24 h时的无差异可能是辛伐他汀对细胞的作用时间不足,尚未引起细胞充分的反映;随着时间的延长,48 h时组的蛋白含量高于对照组,且 $10^{-6}$  mol/L组的结果显著,表明随浓度的增加,高剂量的辛伐他汀更能促进细胞蛋白的合成;对于72 h的结果,我们认为这可能与细胞在有限的空间培养有关。当培养空间一定时,基质分泌的增多必然会限制细胞的生长。72 h时辛伐他汀组蛋白含量的增高必然导致的基质成分的增加,从而会限制细胞的分裂速度,比较而言,对照组细胞的分裂速度则相对较快,从而在一定程度上弥补了蛋白分泌功能上的不足,因此辛伐他汀组蛋白含量虽高于对照组,但未见明显差异。

### 3.3 有关辛伐他汀与细胞增殖能力的探讨

目前有关辛伐他汀影响细胞增殖的报导并不多见。Ortiz及Carlberg等<sup>[11]</sup>认为,他汀类药物作为胆固醇代谢限速酶HMG-C抑制OA的剂阻断了甲醛戊酸途径,遏制了甲醛戊酸(MVA)的产生,而甲醛戊酸是非甾体类异戊二烯的前体,这可能使一些非甾体类异戊二烯化产物生成下降,使细胞内许多蛋白质的异戊二烯化修饰受到抑制,从而影响许多重要蛋白质在细胞内的生物活性,最终影响到细胞的生长和细胞周期的调控。Maeda等评价了他汀类药物对前成骨细胞系(MC3T3-E1)的作用,发现辛伐他汀(simvastatin)呈时间-剂量依赖性增加了骨形态发生蛋白BMP-2的表达。而Hay等<sup>[12]</sup>报道,BMP-2对来源于新生儿颅骨的成骨前体细胞(HNC),无论在短期48 h,还是在长期3 w的培养中,BMP-2都抑制了HNC细胞的增殖;国内温学红等<sup>[13]</sup>亦发现BMP-2对成骨细胞的增殖有抑制作用。张柳、KI Hyun Baek等<sup>[14,15]</sup>报道辛伐他汀可能抑制骨髓基质干细胞的增殖。此外,亦有研究报道辛伐他汀能够抑制平滑肌细胞的生长<sup>[16]</sup>。本试验的研究结果表明,辛伐他汀对MC3T3-E1细胞的生长无明显影响,即未促进MC3T3-E1细胞的增殖,也未对MC3T3-E1细胞的生长有明显的抑制作用,这同以往的报道基本相符合。虽然未影响细胞的增殖,但我们在试验中发现,辛伐他汀能够促进细胞的蛋白质合成功能,这在一定程度上改善了成骨细胞功能下降的情况。

综上所述,我们认为辛伐他汀在体外试验中促进了成骨样细胞MC3T3-E1的蛋白合成功能,而对

成骨样细胞 MC3T3-E1 的增殖无明显影响。这对提高成骨细胞的功能,预防骨质疏松的发生具有一定的积极作用。

### 【参 考 文 献】

[ 1 ] Bauer DC. HMG CoA reductase inhibitors and the skeleton : a comprehensive review. Osteoporos Int 2003 ,14 :273-282.

[ 2 ] Mundy G , Garrett R , Harris S , et al. Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by statins. Science ,1999 ,286 :1946-1949.

[ 3 ] Sudo H , Kodama H. *In vitro* differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from new born mouse calvaria. J Cell Biol ,1983 ,96( 1 ) :191-198.

[ 4 ] Wang D. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct *in vitro* and *in vivo* differentiation/mineralization potential. J Bone Miner , Res ,1999 ,14 :893-903.

[ 5 ] 陈瑞铭.动物组织培养技术及应用.科学技术出版社 ,1991 , 130.

[ 6 ] 赵武述 陈仁 ,卞志强.现代临床免疫学.北京 :人民军医出版社 ,1994 ,136-139.

[ 7 ] 曹雪涛.白细胞介素-2的基础和临床.北京 :北京科学技术出版社 ,1990 4-79.

[ 8 ] 李鸣.NAC 酶反应比色法的影响因素探讨.中国免疫学杂志 , 1990 3( 3 ) :175-177.

[ 9 ] Maeda T , Matsunuma A , Kawane T , et al. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. Biochem Biophys Res Commun ,2001 ,280( 3 ) 874-877.

[ 10 ] Maeda T , Matsunuma A , Kurahashi I , et al. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. J Cell Biochem , 2004 ,92( 3 ) 458-471.

[ 11 ] Oritz MB , Goin M. Mevalonate dependency of early cell cycle mitogenic response to epidermal growth factor and PGF- in Swiss mouse 3T3 cells. J Cell Physiol ,1995 ,162 :139-146.

[ 12 ] Hay E , Hot M , Grauleta , et al. Effect of bone morphogenetic protein 2 on human neonatal calvaria cell differentiation. J Cell Biochem , 1999 ,72 :81-93.

[ 13 ] 温学红.BMP-2 和地塞米松对成人成骨细胞增殖和分化的影响.中国临床实验杂志 2005 22( 1 ) 34-37.

[ 14 ] KI Hyun Baek. The effect of Simvastatin on the Proliferation and Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells. J Korean Med Sci 2005 20 :438-444.

[ 15 ] 张柳.辛伐他汀促进大鼠骨髓基质细胞的成骨分化.中国骨质疏松杂志 2006( 12 ) :278-282.

[ 16 ] Hidaka Y , Eda T , Yonemoto M , et al. Inhibition of cultured vascular smooth muscle cell migration by simvastatin ( MK-733 ). Atherosclerosis ,1992 ,95 :87-94.

( 收稿日期 :2007-09-12 )