

辛伐他汀对老年大鼠骨髓基质干细胞成骨和成脂分化的影响

刘铭 朱振安 汤亭亭 王克敏

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)06-0414-09

摘要:目的 从细胞和基因水平探讨辛伐他汀对老年大鼠骨髓基质干细胞成骨和成脂分化的影响。方法 18 月龄雄性 SD 大鼠的骨髓基质干细胞进行成骨和成脂诱导培养, 培养介质中加入辛伐他汀(10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} mol/L 和 10^{-9} mol/L), 同时设溶剂对照组。成骨检测: 碱性磷酸酶(ALP)染色和定量, 茜素红矿化染色和定量, ALP 和骨钙素(OC)基因分析; 成脂检测: 油红脂肪细胞染色和定量, 脂蛋白脂酶(LPL)和过氧化物酶增殖活化受体(PPAR γ_2)基因分析。结果 在含有低剂量地塞米松的成骨诱导条件下, 辛伐他汀随浓度增加促进了细胞基质的矿化, 增强了 ALP 的活性及染色, 提高了 ALP 和 OC 的基因表达(若无地塞米松, 辛伐他汀则无法单独诱导成骨, 此结果未展示); 同时, 辛伐他汀随浓度增加减弱了脂肪细胞的油红染色, 抑制了 LPL 和 PPAR γ_2 的基因表达。显著性差异皆发生于 10^{-6} mol/L 和 10^{-7} mol/L 辛伐他汀组。结论 辛伐他汀随浓度增加抑制了老年骨髓基质干细胞的成脂分化, 并中等强度地促进了老年骨髓基质干细胞的成骨分化。这表明辛伐他汀具有促进骨合成代谢的作用, 可以用于治疗常见的骨代谢疾病, 如增龄性的骨质疏松症。

关键词: 辛伐他汀; 老年; 骨髓基质干细胞; 成骨细胞; 脂肪细胞; 细胞分化

doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.06.006

The effect of simvastatin on the differentiation of marrow stromal cells from aging rats LIU Ming, ZHU Zhenan, TANG Tingting, et al. Orthopaedic Department, the Ninth People Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011, China

Abstract: **Objective** To assess the effect of simvastatin on osteoblastic and adipocytic differentiation of marrow stromal cells(MSCs) from aging rats. **Methods** MSCs from 18-month-old SD rats were cultured in osteogenesis or adipogenesis conditions. Simvastatin, including 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} and 10^{-9} mol/L, is added into culture medium. Osteogenesis test: alkaline phosphatase(ALP) activity and staining, gene expression of ALP and osteocalcin(OC), mineralization staining. Adipogenesis test: Oil Red O staining gene expression of lipoprotein lipase(LPL) and peroxisome proliferator activated receptor(PPAR γ_2). **Results** Simvastatin, added into culture medium with a low dose of dexamethasone, enhanced ALP activity and staining, increased the gene expression of ALP and OC, and promoted mineralization in a dose-dependent fashion. Simultaneously, simvastatin also decreased Oil Red O staining and inhibited the gene expression of LPL and PPAR γ_2 in a dose-dependent fashion. Significant effects were observed at 10^{-6} and 10^{-7} mol/L simvastatin($P < 0.05$). **Conclusion** These results indicate that simvastatin has anabolic effects on bone through the inhibition of adipocytic differentiation and the modest promotion of osteoblastic differentiation, suggesting that it could be used for the treatment of common metabolic bone diseases, such as aged osteoporosis.

Key words: Simvastatin; Aging; Marrow stromal cells; Osteoblast; Adipocyte; Cell differentiation

作者单位: 200011 上海, 上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科(刘铭、朱振安、汤亭亭); 上海交通大学医学院基础医学院生物化学和分子生物学教研室(王克敏)

通讯作者: 朱振安, Email: zhuzhenan2006@126.com

辛伐他汀类属于 3-羟基 3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂, 是一种传统的降血脂药物。近来报道, 辛伐他汀在体外能够促进细胞系或来源于幼年大鼠的骨髓基质干细胞(Marrow stromal

cells ,MSCs)的成骨活动。MSCs 是一种多能干细胞 ,具有多向分化潜能 ,在不同的生物环境和细胞因子的作用下可向不同的方向转化 ,不仅能够分化为成骨细胞 ,还可以分化为脂肪细胞、成软骨细胞、生肌细胞 ,甚至神经细胞等^[1]。随着增龄 ,MSCs 的成骨分化能力逐渐降低 ,而成脂分化能力则相对增强 ,在临床中即表现为骨质疏松症患者的骨量减少与髓腔内的脂肪增多总是相伴出现 ,这一现象目前已为大家所公认。然而 ,来源于老年个体的骨髓基质干细胞的分化是否受辛伐他汀的影响却始终未见报道。因此 ,笔者以老年大鼠的骨髓基质干细胞作为研究对象 ,观察不同浓度的辛伐他汀对增龄个体的骨髓基质干细胞的成骨分化和成脂分化的影响 ,以探讨其治疗老年骨质疏松的可能机制。

1 材料和方法

1.1 细胞来源及主要试剂及仪器

增龄大鼠骨髓基质干细胞 :18 月龄雄性 SD 大鼠(中英合资上海 BK 实验动物有限公司)地塞米松、β-磷酸甘油、磷酸抗坏血酸、胰岛素、异丁基甲基黄嘌呤(IBMX)、吡哆美辛、茜素红、油红 O 和 PNPP (Sigma , USA) ,辛伐他汀(Calbiochem , Germany) ,DMEM 细胞培养基和 TRIZOL(invitrogen , USA) ,ALP 染色试剂盒(雨虹 ,上海) ,蛋白定量试剂盒(Rockford , IL , USA) ,RT 逆转录试剂盒和 PCR 高保真扩增试剂盒(BCI , Canada) ,紫外分光光度计(NanoDrop ND-100 , USA) ,PCR 基因扩增仪(Biometra , Germany) ,电泳仪和凝胶成像系统(BIO-RAD , Italy) 酶标仪(Bio-TEK , Synergy HT , USA)。

1.2 大鼠 MSCs 的分离培养

18 月龄雄性 SD 大鼠 ,2.5% 戊巴比妥钠 10 ~ 15 mg/kg 行腹腔内注射麻醉 ,摘除双侧后肢 ,浸泡在 75% 乙醇中 5 min ,再用无菌生理盐水冲洗至无乙醇 ,置于无菌托盘上 ,剥除股骨、胫骨表面附着的肌肉等组织 ,无菌 PBS 反复冲洗。剪刀祛除股骨近端和胫骨远端暴露骨髓 ,再祛除另端的骨髓 ,先用 7 号针头穿刺骨端 ,DMEM 完全培养液(10% 胎牛血清、青霉素 100U/mL 及链霉素 100μg/mL)冲出骨髓腔中的骨髓至另一无菌平皿中 ,反复冲洗 3 次 ,再用 5 号针头冲洗 3 次 ,尽量避免产生气泡。48h 后每天换液 1 次 ,连续换液 3d ,此后每 3 天换液 1 次。

1.3 MSCs 的成骨分化

选取第 1、2 代 MSCs 为研究对象 ,待细胞单层融合后 ,以含不同浓度辛伐他汀(10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹

mol/L)的成骨诱导液(10nmol/L 地塞米松、10 mmol/L β-甘油磷酸钠、50 μg/mL 磷酸抗坏血酸)继续培养 ,同时设溶剂对照组 ,分别进行 ALP 染色、定量 ,茜素红矿化染色、定量和逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 ALP 和 OC 的基因表达。

1.3.1 ALP 染色和定量 :成骨诱导后第 10 天进行 ALP 染色 :①吸去培养液 ,PBS 冲洗 1 次 ;固定液固定 20 s ,4℃ ,PBS 冲洗 3 次 ;底物溶于二甲基甲酰胺中 ,加入缓冲液中 ;将固紫 B 加入缓冲液中 ,配成混合液 ;将混合液加入至六孔板中 ,刚能覆盖即可 ,37℃ 2 h ,流水冲洗 ;显微镜观察。②吸去培养液 ,50 mmol/L Tris 缓冲盐水(TBS ,pH 7.4)冲洗 1 次 ;TBS 3 mL/皿 ,刮下细胞 ,反复冻融 3 次完全裂解细胞 ;每 50 μL 样品加入 50 μL PNPP ,置于 37℃ 恒温摇床中孵育 15 min ,加入 25 μL 3N NaOH 溶液终止反应 ,酶标仪测定波长 405 nm 的吸光度值 ;等量样品以 BCA 法测定总蛋白含量 ,酶标仪测定波长 562 nm 的吸光度值 ;分别以总蛋白含量为校对值 ,得出 ALP 活性的测定值。

1.3.2 茜素红矿化染色及定量 :成骨诱导后第 28 天行茜素红矿化染色 :PBS 冲洗 3 次 ;冰 70% 乙醇固定 1 h ;去离子水洗 3 次 ,茜素红室温染色 10 min ;去离子水洗 5 次 ;PBS 孵育 15 min ,祛除非特异结合 ;显微镜观察 ;氯化十六烷基吡啶(CPC)孵育 15 min 释放已附着于矿化结节的茜素红 ,酶标仪测定 562 nm 波长的吸光度值。

1.3.3 RT-PCR :成骨诱导第 10 天和 28 天 ,分别检测 ALP 和 OC 的基因表达 ,引物序列和反应条件见表 1。PCR 产物 10 μL ,在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳 40 min ,电压 100 V ,BIO-RAD 凝胶处理系统观察并拍照。分别以 β-actin 为参考基因 ,行半定量分析。

表 1 成骨和成脂相关基因的引物序列和反应条件

Gene	Primer sequence (forward/reverse)	T annealing (℃)	Cycles
ALP (418 bp)	5'-CTACTTGTGTGGCGTGAAGG-3' 5'-AATGCTGATGAGGTCCAGG-3'	54	30
OC (249 bp)	5'-GCAGAAGGGAAGGGAC-3' 5'-GAACAGAGGCACAGGAT-3'	54	30
LPL (208 bp)	5'-ATCCAGCTGGGCCTAACITT-3' 5'-AATGGCTTCTCCAATGTTC-3'	52	30
PPARγ ₂ (248 bp)	5'-TATGGAGCCTAAGTTTGAAGT-3' 5'-CAATCTGCCTGAGGTCTG-3'	54	30
β-actin (230 bp)	5'-CCGTAAAGACCTCTATGCCAACA-3' 5'-CGGACTCATCTACTCTCTGCT-3'	54	28

1.4 MSCs 的成脂分化

选取第 1、2 代 MSCs 为研究对象,待细胞融合后,以含不同浓度辛伐他汀(10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} mol/L)的成脂诱导液(10^{-6} mol/L 地塞米松、0.1 mmol/L 吡哆美辛、0.5 mmol/L 异丁基甲基黄嘌呤、10 mmol/L 胰岛素)继续培养,同时设溶剂对照组,进行油红 O 脂肪细胞染色及 RT-PCR 检测 LPL 和 PPAR γ_2 的基因表达。

1.4.1 油红 O 染色及定量:成脂诱导第 18 天:PBS 清洗 1 次;27% 甲醛固定 20 min;去离子水润洗 3 次;空气干燥 0.5% 油红 O 染色 1 h;70% 乙醇洗涤 3 次;相差显微镜下观察并拍照,随机选取 500 细胞/培养孔并计数油 O 染色阳性细胞。

1.4.2 RT-PCR:成脂诱导第 2 天和 18 天,分别检测 LPL 和 PPAR γ_2 的基因表达,引物序列和反应条件见表 1。PCR 产物 10 μ L,在 1.5% 琼脂糖凝胶

上电泳 40 min,电压 100 V,BIO-RAD 凝胶处理系统观察并拍照。分别以 β -actin 为参考基因,行半定量分析。

1.5 统计学处理

SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差检验(One-Way ANOVA),各组间的差异用 Tukey 法比较,选定 $P < 0.05$ 为显著差异。

2 结果

2.1 ALP 染色和定量结果

随辛伐他汀浓度的提高,紫蓝色阳性染色区域的面积明显增加。同溶剂对照组相比较,辛伐他汀 10^{-6} mol/L 组染色最强、染色面积最大, 10^{-7} mol/L 组次之, 10^{-8} 及 10^{-9} mol/L 组染色强度逐渐下降(图 1 A ~ E)。

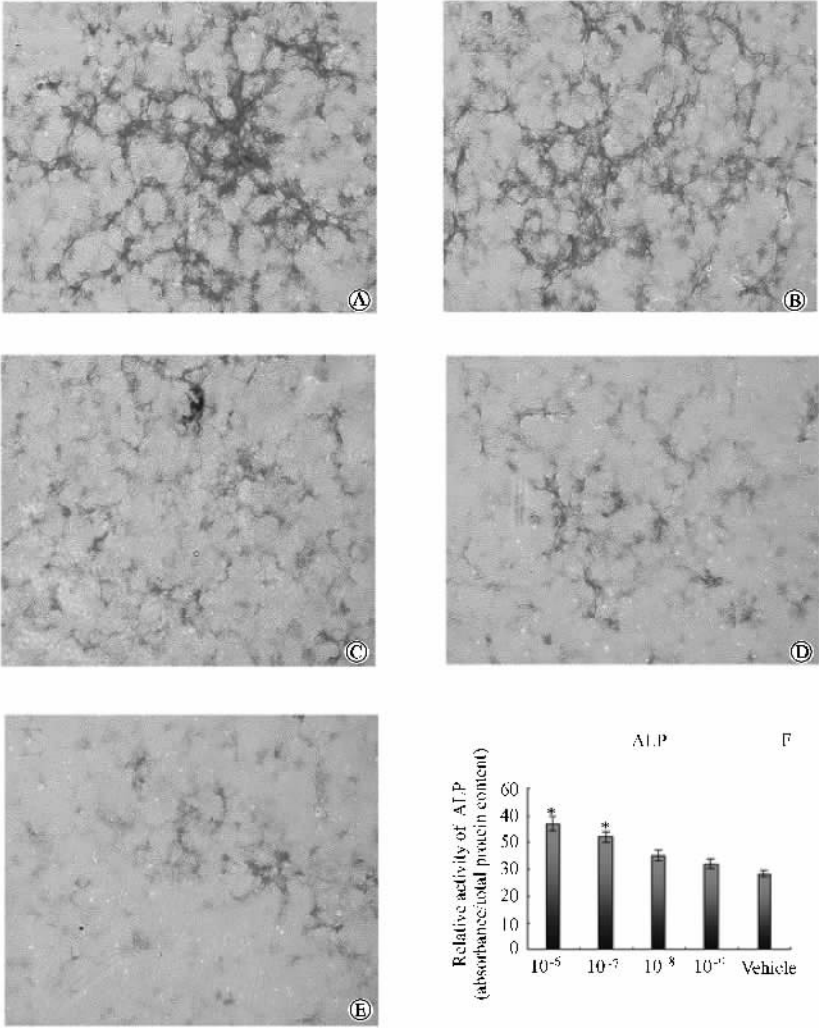


图 1 ALP 染色和定量

A ~ D 为辛伐他汀 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 及 10^{-9} mol/L 四个浓度组,E 为溶剂对照组。随辛伐他汀浓度的降低,染色阳性区域面积明显减少,同溶剂对照组相比, 10^{-6} 和 10^{-7} mol/L 组差异明显。F 为定量直方图,* $P < 0.05$

以总蛋白含量为校正值,行 ALP 活性定量。同溶剂对照组相比较,辛伐他汀 10^{-6} 和 10^{-7} mol/L 组 ALP 活性明显增强 ($P < 0.05$) (图 1 F)。

2.2 茜素红矿化染色和定量结果

随辛伐他汀浓度的提高,猩红色阳性染色区域的面积明显增加。同溶剂对照组相比较,辛伐他汀

10^{-6} mol/L 组染色最强、钙化斑块数量及染色面积最大, 10^{-7} mol/L 组次之, 10^{-8} 及 10^{-9} mol/L 组染色强度逐渐下降(图 2 A ~ E)。茜素红定量检测与染色结果相似,同溶剂对照组相比较,辛伐他汀 10^{-6} 和 10^{-7} mol/L 组明显增强 ($P < 0.05$) (图 2 F)。

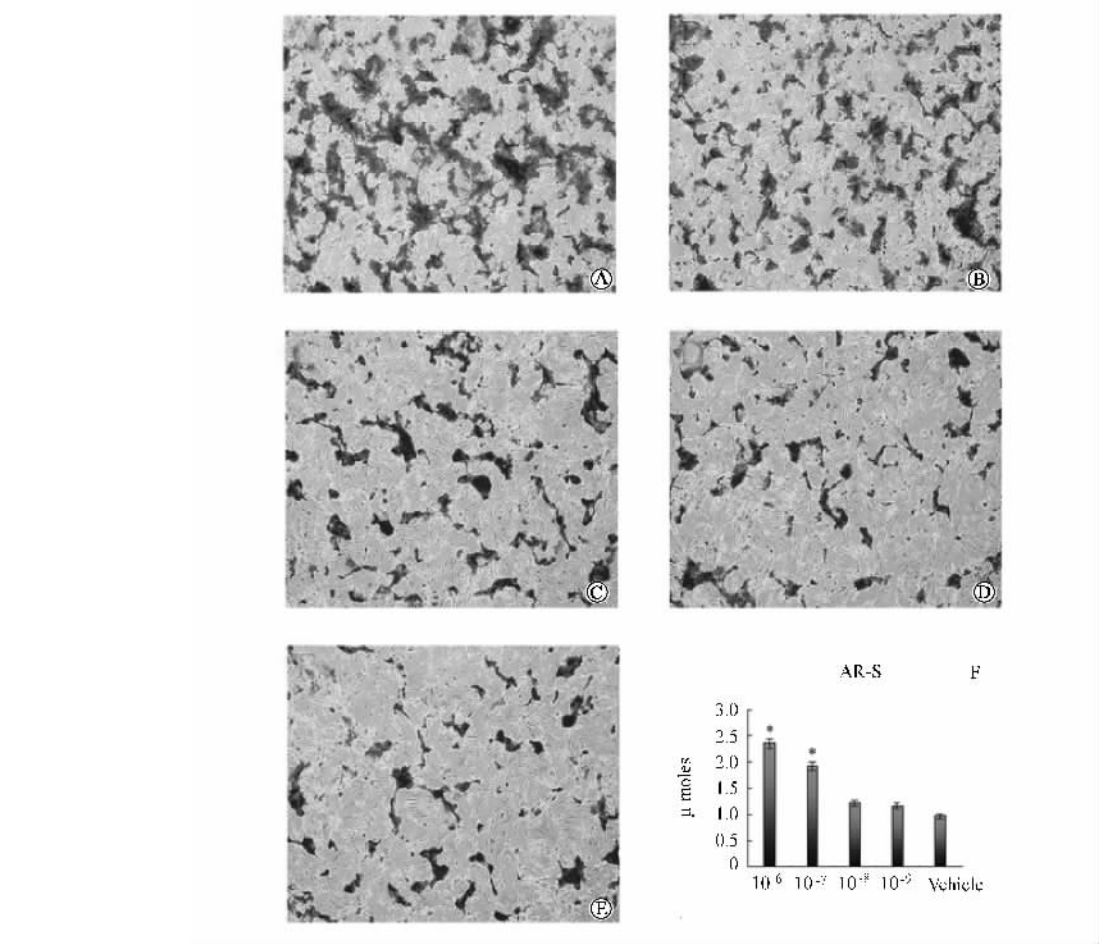


图 2 茜素红矿化染色和定量

A ~ D 为辛伐他汀 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 及 10^{-9} mol/L 四个浓度组, E 为溶剂对照组。随辛伐他汀浓度的降低, 染色阳性区域面积明显减少, 同溶剂对照组相比, 10^{-6} 和 10^{-7} mol/L 组差异明显。F 为定量直方图, * $P < 0.05$

2.3 RT-PCR 结果

随辛伐他汀浓度的增加, ALP 和 OC 的基因条强度明显提高, 而 β -actin 的基因表达则较为一致。以 β -actin 为内参行半定量分析, 同溶剂对照组相比较, 辛伐他汀 10^{-6} 和 10^{-7} mol/L 组基因表达明显增强 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.4 油红 O 染色及定量结果

成脂诱导后, 部分细胞体积逐渐增大、变圆, 细胞内出现空泡样结构并含有大小不等的脂肪滴, 随诱导时间延长, 含脂滴细胞数逐渐增多, 脂滴体积增

大, 占细胞体积 70% ~ 90%, 形态与成熟脂肪细胞相似, 一般 2 ~ 3 w 时脂肪样细胞数最多, 3 w 后脂肪样细胞便逐渐飘浮脱落, 因此选择第 18 天作为检测时间点。油红 O 染色阳性表现为胞内脂滴被染为亮红色。溶剂对照组红染细胞数最多, 染色面积最大, 而辛伐他汀组随浓度增加红染细胞阳性率及染色面积明显下降, 于最大浓度 10^{-6} mol/L 组几乎少有红染细胞, 差异有统计学意义 (图 4 A ~ E)。进而行半定量分析表明, 同溶剂对照组相比较, 辛伐他汀 10^{-6} mol/L 组 ($P < 0.01$) 和 10^{-7} mol/L ($P < 0.05$) 差

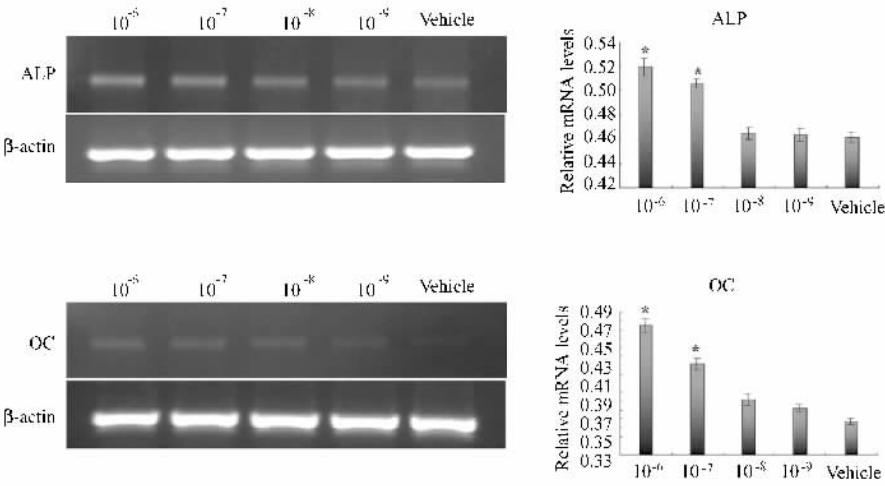


图 3 成骨分化标志物 ALP 和 OC 的基因表达

* $P < 0.05$

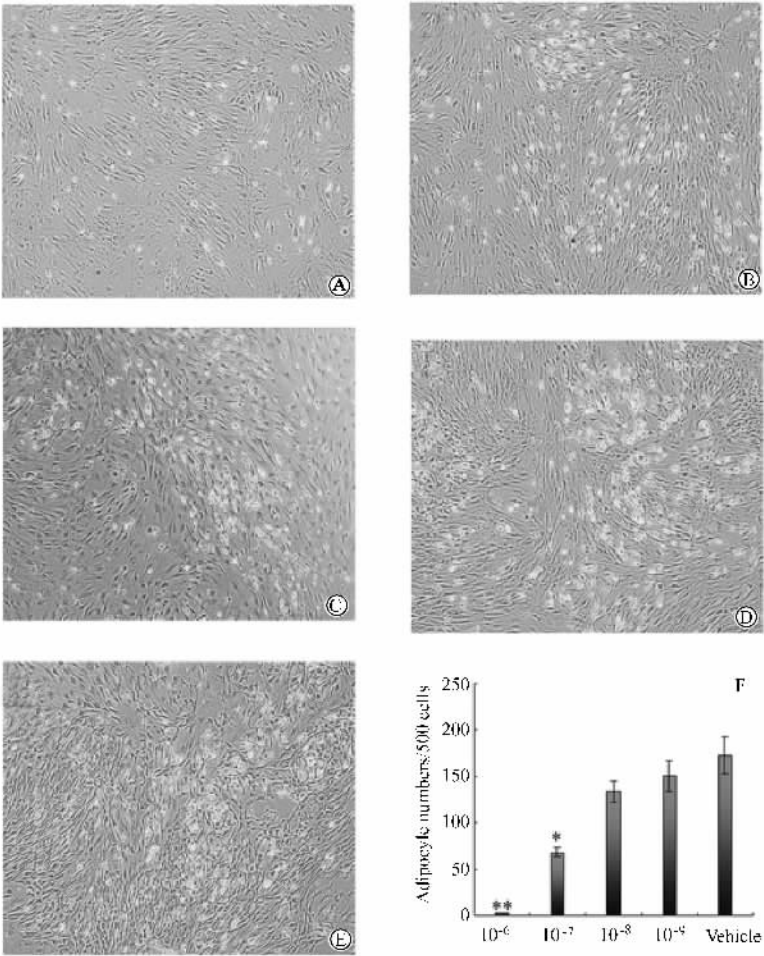


图 4 油红 O 染色及定量

A ~ D 为辛伐他汀 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 及 10^{-9} mol/L 四个浓度组, E 为溶剂对照组。随辛伐他汀浓度的增高, 染色阳性区域面积明显减少, 同溶剂对照组相比, 10^{-6} 和 10^{-7} mol/L 组差异明显。F 为定量直方图, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

异有统计学意义(图 4 F)。

2.5 RT-PCR 结果

LPL 和 PPAR γ_2 的基因表达,于溶剂对照组最强,随辛伐他汀浓度的增加基因表达强度则逐渐减

弱,而 β -actin 的表达则较为一致。以 β -actin 为内参行半定量分析,同溶剂对照组相比较,辛伐他汀 10^{-6} mol/L 组 ($P < 0.01$) 和 10^{-7} mol/L 组 ($P < 0.05$) 基因表达强度明显降低(图 5)。

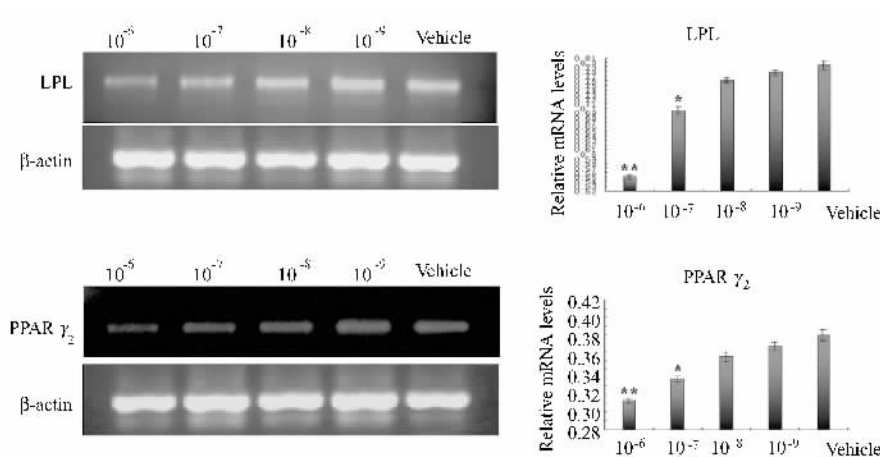


图 5 成脂分化标志物 LPL 和 PPAR γ_2 的基因表达

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

3.1 选择老龄大鼠作为骨髓基质干细胞来源的原因

大鼠、小鼠、兔、狗、猪、羊、猴等动物复制骨质疏松或骨量丢失的模型已有报道^[2]。其中,大鼠的骨代谢情况与人类接近,且来源经济、易得并易于饲养,故在复制模型中使用最多。一般大鼠的生命周期为 2~3 年,大鼠 2 个月龄时性腺已基本发育成熟,但此时体重、骨骼长度、骨密度以及骨钙含量仍处于快速增长阶段;至 3 个月龄时,性腺和内分泌系统才发育成熟,肌肉、骨骼基本成型;3~6 个月龄大鼠骨骼处于缓慢增长阶段,变化较小;6~12 个月龄时骨密度与骨钙含量变化最小;到 12 个月龄时骨代谢检测指标达到坪值水平,因此大鼠超过 15 月龄即可视为老龄^[3]。Kajkenova 等^[4]发现快速衰老模型小鼠 SAMP6 骨髓中的成骨细胞生成能力下降,表现为骨生成速率下降和骨钙化密度下降,而骨髓中脂肪细胞克隆形成单位和已分化成熟的脂肪细胞数量却都增加。此外还有实验结果表明^[5],随着年龄的增长或去卵巢皆可导致骨髓基质干细胞的数量减少,成骨分化的能力和生物学功能下降,而成脂肪分化的能力及生物学功能则增强。低龄个体的骨髓基质干细胞功能则恰恰与之相反,成骨能力强而成脂能力弱。然而,以往的研究皆以低龄个体(如 3 个月)来源的骨髓基质干细胞或细胞系作为研究对象,这

对于研究目的为促进成骨和抑制成脂而言,难以真实地反映药物对骨髓基质干细胞双向分化的影响。因此,本研究选择 18 月龄老年大鼠的骨髓基质干细胞作为研究对象,更能反映辛伐他汀对骨髓基质干细胞的真实作用,为骨质疏松症的防治提供更为确切的依据。

3.2 辛伐他汀促进骨髓基质干细胞成骨分化的探讨

他汀类药物属于 3-羟基 3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂,临床中主要用于降低胆固醇^[6]。不同的他汀类药物被报道对骨代谢有作用,其中洛伐他汀 (Lovastatin) 和普伐他汀 (Pitavastatin) 作用较小,辛伐他汀、阿托伐他汀 (atorvastatin) 和西力伐他汀 (cerivastatin) 作用较大^[7]。然而,西力伐他汀因具有严重的骨骼肌溶解等并发症已退市,普伐他汀的市场销售占有率则远低于辛伐他汀,因此我们选择了辛伐他汀作为研究对象。Mundy 等^[8]1999 年首次报道他汀类药物(辛伐他汀和洛伐他汀)可促进鼠 (2T3) 或人 (MG-63) 永生型成骨样细胞系骨形态发生蛋白-2 (BMP-2) 的基因表达及其蛋白分泌,并且在体内可促进裸鼠的颅骨修复。此后, Sugiyama^[9] 和 Ohnaka 等^[10] 亦报道辛伐他汀可增强人骨肉瘤细胞的 BMP-2 基因表达及其蛋白分泌, Maeda T 等报道辛伐他汀可增强前成骨细胞系 (MC3T3-E1) 和低龄大鼠 MSCs 表达 BMP-2 和血管内皮生长因子 (VEGF),并可其促进矿化。由于

老龄个体 MSCs 的成骨分化能力逊于低龄个体,而上述研究皆以低龄个体(如3个月)来源的骨髓基质干细胞或细胞系作为研究对象,并不能反应辛伐他汀对老龄个体 MSCs 的作用,即无法在体外研究中阐明辛伐他汀对老年性骨质疏松等骨代谢疾病有确切的作用,因此本研究以老龄个体 MSCs 为研究对象,国内外尚属首次。

本研究采用的成骨细胞分化诱导液包括地塞米松、 β -磷酸甘油和磷酸抗坏血酸。低剂量的地塞米松(10^{-7} mol/L)可促进骨髓基质细胞向成骨细胞分化,其作用机制可能是地塞米松能增加增殖因子受体,从而促进成骨细胞的增殖^[11]。 β -磷酸甘油可提供磷离子作为碱性磷酸酶的底物,从而加速结节钙化。Coelho 等^[12]认为只有 β -磷酸甘油存在时骨髓基质细胞才发生矿化结节的沉积。磷酸抗坏血酸是胶原中脯氨酸和赖氨酸末端羟基化的影响因子,能通过诱导成骨细胞特异性分化蛋白基因的表达,来诱导碱性磷酸酶活性的增加,同时增加钙盐的沉积和促进钙化结节的形成;其也可单独促进骨髓基质细胞向成骨细胞转化^[13]。

碱性磷酸酶是骨形成所必需的酶,是基质成熟的早期标志物,成骨细胞分泌 ALP 和钙盐晶体至细胞外基质中,ALP 使局部磷酸含量增高,促使基质矿化,即使在骨细胞的形成期碱性磷酸酶的表达依然很强^[14],因此 ALP 染色及活性测定是成骨检测较为常用的方法。但除骨组织外,软骨、肝、肾等组织也均表达 ALP,因此我们进一步行矿化结节染色以证实 MSCs 的成骨分化。组织内的钙质大部分以磷酸钙或碳酸钙的形式存在,茜素红 AR-S 法通过钙离子与茜素红特异性结合,可使矿化结节呈现鲜红色,因此茜素红染色和定量检测是鉴定成骨分化较特异的方法。在基因水平,ALP 基因是成骨细胞分化的早期标志物^[15],OC 基因则是成骨细胞分化的成熟期或晚期标志物^[16]。当培养细胞逐步进入矿化期时,细胞内的 ALP 表达下降,而 OC 基因则开始表达并逐渐达到表达峰值。因此,在研究中我们分别选择第10天和第28天作为检测时间点。

本研究通过上述 ALP 染色与定量、矿化结节染色与定量,及 ALP 和 OC 基因表达的检测得出了相似的结果,从细胞和基因水平证实了辛伐他汀可呈剂量依赖性地促进增龄个体 MSCs 的成骨分化。但我们在试验中亦发现,若在诱导液中祛除地塞米松,辛伐他汀则无任何促进矿化的作用,这说明辛伐他汀并不具有诱导未分化的骨髓基质干细胞向成骨细

胞转化的作用,仅仅是促进了 MSCs 的进一步成骨分化的过程。因此,我们认为对辛伐他汀体外成骨更为恰当的评价应当是,辛伐他汀中等强度地促进了增龄骨髓基质干细胞的成骨分化。

3.3 辛伐他汀抑制骨髓基质干细胞成脂分化的探讨

骨质疏松症是以骨量减少、骨微结构退化为特征,致使脆性增加而易于发生骨折的一种全身性骨骼疾病。随着年龄的增加,骨髓中的脂肪细胞数量逐渐增多,甚至在四肢长骨中90%的骨髓腔被脂肪细胞所充满。增龄、去卵巢及其他原因造成的骨质疏松都存在骨髓脂肪细胞逐渐增多而同时骨量减少的现象,已有研究证实骨髓中脂肪细胞的数量与松质骨骨量成反比^[17]。骨髓基质干细胞是存在于骨髓中的具有高度增殖及分化能力的多潜能干细胞,是成骨细胞和脂肪细胞的共同前体细胞,当骨髓基质干细胞向成脂分化的能力大于向成骨分化时则自然可以发生上述现象。因此,如何抑制骨髓基质干细胞的成脂分化已成为骨质疏松防治中的重大研究课题。然而,有关这方面的研究至今仍较少。Li 等^[18]研究了洛伐他汀 Lovastatin 对多功能骨髓间充质细胞-D1 细胞系(具有成骨或成脂双向分化潜能)的作用,结果显示 PPAR γ_2 的表达被降低60%,认为 Lovastatin 可降低成脂细胞基因表达。Song 等^[19]发现辛伐他汀可在体外抑制低龄大鼠骨髓基质干细胞的脂蛋白脂酶 LPL 的基因表达,可以抑制其向脂肪细胞分化。但上述研究仍然皆以低龄个体(如3个月)来源的骨髓基质干细胞或细胞系作为研究对象,缺乏对老龄个体 MSCs 的实际针对性。我们应用辛伐他汀针对老龄个体 MSCs 为研究内容,在国内外亦尚属首次。

本研究采用的成脂细胞分化诱导液包括 10^{-6} mol/L 地塞米松、0.1 mmol/L 吡哆美辛、0.5 mmol/L 异丁基甲基黄嘌呤和 10 mmol/L 胰岛素。地塞米松可激活核激素受体超家族成员糖皮质激素的受体,诱导 C/EBP α (成脂调控因子)的产生,同时降低脂肪细胞分化抑制因子 pre21 的表达,低剂量的地塞米松(10^{-8} 、 10^{-9} mol/L)能促进成骨细胞的合成促细胞成骨分化,但高剂量的地塞米松(如 10^{-6} mol/L)则抑制骨钙素的合成并下调矿化蛋白(LMP-1) mRNA 的表达^[20],吡哆美辛通过激活 PPAR γ 促进脂肪细胞的生成^[21],异丁基甲基黄嘌呤 IBMX 是磷酸二酯酶的特异性抑制剂,通过抑制 cAMP 的降解而提高细胞内 cAMP 的水平。后者通过激活 cAMP 反应元件结

合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)来调控 C/EBP α 和 C/EBP β 的表达,促进脂肪细胞的产生^[22],胰岛素可提高细胞的分化率,并增加脂肪细胞的脂质积累,主要通过交叉激活胰岛素样生长因子(IGF-1)受体与 IGF-I 受体结合,激活 Akt, Ras, ERK1/ERK2 等信号传导途径以及降低核蛋白磷酸酶 PPA 的活性来调节 CREB 的磷酸化和转录活性,来促进脂肪分化^[23]。以往试验表明^[24],脂肪细胞分化成熟后易于飘浮脱落,诱导时间一般不能超过 3 周,因此我们在试验中分别设定第 2 天和第 18 天作为监测脂肪细胞分化的早期和晚期时间点。

脂肪细胞的特点是能够合成并储存甘油三酯,因此我们应用检测甘油三酯的油红 O 染色作为鉴定脂肪细胞的主要方法,并计数阳性细胞进行半定量分析。结果示红染细胞数量随辛伐他汀浓度的增加而明显减少,且辛伐他汀 10^{-6} 和 10^{-7} mol/L 两个浓度组具有显著差异。

脂肪细胞分化过程中,不同阶段的基因表达产物也不一样。脂蛋白脂酶(Lipoprotein lipase, LPL)和过氧化物酶增殖活化受体 2(Peroxisome proliferator activated receptor γ) PPAR γ_2 被认为是脂肪细胞分化的标志性基因^[25, 26]。LPL 是脂质代谢的关键酶,是未脂化的脂肪酸供给肌肉和脂肪组织过程中的限速酶,其在脂肪细胞分化的早期即开始表达,它的表达预示着脂肪积累的开始。过氧化物酶增殖活化受体 PPARs 是一种核激素受体,与另一核受体树脂样 X 受体(RxR)结合后形成异二聚体,然后作用于特异的过氧化物增生反应元件,最终改变靶细胞的基因调控,其分为 PPAR α , PPAR β 和 PPAR γ 3 个亚族。其中,PPAR γ 是一种成脂因子,是细胞分化及脂质代谢的一个关键性转录调节者,包括 PPAR γ_1 , PPAR γ_2 和 PPAR γ_3 3 种亚型。PPAR γ_1 、3 无特异性,在不同组织中以低水平表达。而 PPAR γ_2 在脂肪细胞的分化和形成中起着重要的作用,其具有组织特异性,仅在脂肪细胞分化过程中表达,尤在成熟脂肪组织中表达最为明显,属于脂肪细胞分化的中晚期基因表达产物。我们在脂肪分化的第 2 天和第 18 天分别检测 LPL 和 PPAR γ_2 的基因表达,结果显示两者的基因表达皆随辛伐他汀浓度的增加而表达强度逐渐减弱。以 β -actin 为内参基因进行半定量分析,辛伐他汀 10^{-6} 和 10^{-7} mol/L 亦具有显著差异。

因此,本研究通过细胞染色、半定量分析和检测特异基因型的表达,从细胞水平和基因水平证实了辛伐他汀可呈剂量依赖性地抑制增龄骨髓基质干细

胞的成脂分化。

综上所述,辛伐他汀随剂量增加可中等强度地促进老年骨髓基质干细胞的成骨分化并可显著抑制老年骨髓基质干细胞的成脂分化。这表明,至少在体外研究中可证实辛伐他汀确实可能成为防治老年性骨质疏松症的有效方法之一。

【参 考 文 献】

- [1] Pit tenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. Science, 1999, 284(5411): 143-147.
- [2] 刘忠厚. 骨质疏松学. 北京: 中国科学出版社, 1998: 501-511.
- [3] Kalu DN, Liu CC. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. Endocrinology, 1989, 124(1): 7-16.
- [4] Kajkenova O, Lecka-Czemik B. Increased adipogenesis and myelopoiesis in the bone marrow of SAMP6, a murine model of defective osteoblastogenesis and low turnover osteopenia. J Bone Miner Res, 1997, 12(11): 1772-1779.
- [5] Bergman RJ, Gazit D, Kahn AJ, et al. Age-related changes in osteogenic stem cells in mice. J Bone Miner Res, 1996, 11(5): 568-577.
- [6] Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. Science, 2001, 292: 1160-1164.
- [7] Mundy GR. Statins and their potential for osteoporosis. Bone, 2001, 29: 495-497.
- [8] Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by statins. Science, 1999, 286: 1946-1949.
- [9] Sugiyama M, Kodama T, Konishi K, et al. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 271: 688-692.
- [10] Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H, et al. Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 287: 337-342.
- [11] Varga F, Luegmayer E, Fratzl-Zelman N, et al. Triiodothyronine inhibits multilayer formation of the osteoblastic cell line, MC3T3E1, by promoting apoptosis. J Endocrinol, 1999, 160: 572-651.
- [12] Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing I. Part II: effect of ascorbic acid, beta2glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. Biomaterials, 2000, 21: 1095-1121.
- [13] Otsuka E, Yamaguchi A, Hirose S, et al. Characterization of osteoblastic differentiation of stromal cell line ST2 that is induced by ascorbic acid. Am J Physiol, 1999, 277: 1322-1381.
- [14] Qu Q, Peralta-Heape M, Kapanen A, et al. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. Bone, 1998, 22: 2012-2091.
- [15] Gori F, Thomas T, Hicok KC, et al. Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and

- inhibits late adipocyte maturation. *J Bone Miner Res*, 1999, 14 : 1522-1535.
- [16] Aubin JE, Liu F, Malaval L, et al. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*, 1995, 17 : 77S-83S.
- [17] Ahdjoudj S, Lasmoles F, Oyajobi BO, et al. Reciprocal control of osteoblast/chondroblast and osteoblast/adipocyte differentiation of multipotential clonal human marrow stromal F/STRO21 (+) cells. *Cell Biochem*, 2001, 81 : 232-238.
- [18] Li X, Cui Q, Kao C, et al. Lovastatin inhibits adipogenic and stimulates osteogenic differentiation by suppressing PPARgamma2 and increasing Cbfa1/Runx2 expression in bone marrow mesenchymal cell cultures. *Bone*, 2003, 33(4) : 652-659.
- [19] Song C, Guo Z, Ma Q, et al. Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 308 : 458-462.
- [20] 刘素彩, 张志勇, 李恩. 高浓度地塞米松通过下调 LMP-1 表达抑制大鼠成骨细胞的分化. *生理学报*, 2002, 54(1) : 33-37.
- [21] Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, et al. Peroxisome proliferator activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Biol Chem*, 1997, 272 : 3406-3410.
- [22] Reusch JE, Klemm DJ, Lyle RE, et al. Inhibition of camp response element binding protein activity decreases protein kinase BPAkt expression in 3T3L1 adipocytes and induces apoptosis. *J Biol Chem*, 2002, 277(2) : 1426-1432.
- [23] Klemm DJ, Roesler WJ, Boras T, et al. Insulin stimulates cAMP response element binding protein activity in HepG and 3T3L1 cell lines. *J Biol Chem*, 1998, 273 : 917-923.
- [24] Tropel P, Noël D, Platet N, et al. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Experimental Cell Research*, 2004, 295(2) : 395-406.
- [25] Wu Z, Bucher NL, Farmer SR. Induction of peroxisome proliferator activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(8) : 4128-4136.
- [26] Ailhaud G. Early adipocyte differentiation. *Biochem Soc Trans*, 1996, 24(2) : 400-402.

(收稿日期 : 2009-02-13)