

# 瑞舒伐他汀对体外培养人成骨细胞增殖及 LRP5、Runx2 基因表达的影响

谭璐<sup>1</sup> 董进<sup>2\*</sup>

1. 山西医科大学 2010 级内分泌科硕士研究生, 山西 太原 030001

2. 山西医科大学第一临床医学院内分泌科, 山西 太原 030001

中图分类号: R329.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013) 11-1119-04

**摘要:** **目的** 观察不同浓度的瑞舒伐他汀对体外培养的人成骨细胞增殖及 LRP5、Runx2 基因表达的影响, 探讨瑞舒伐他汀影响骨代谢可能的分子机制。 **方法** (1) 成骨细胞的培养与鉴定; (2) 给予不同浓度 ( $0$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$  mol/L) 的瑞舒伐他汀刺激体外培养的人成骨细胞, 24 h 后采用 CCK-8 比色法检测细胞的增殖能力, 用荧光定量 PCR 法检测 LRP5、Runx2 的相对表达水平。 **结果** 瑞舒伐他汀可明显促进细胞增殖 ( $P < 0.05$ ), 并促进成骨细胞 LRP5、Runx2 基因的表达 ( $P < 0.05$ ),  $10^{-7}$  M 增殖最明显, 基因的表达量最高。 **结论** 瑞舒伐他汀可促进成骨细胞的增殖, 可能与 LRP5、Runx2 基因表达增加有关。 **关键词:** 瑞舒伐他汀; 成骨细胞; 增殖; LRP5; Runx2

## Effect of rosuvastatin on the proliferation of human osteoblasts in vitro and the gene expression of LRP5 and Runx2

TAN Lu, DONG Jin

Department of Endocrinology, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: DONG Jin, Email: SDYYDJ@medmail.com.cn

**Abstract: Objective** To observe the effect of different concentrations of rosuvastatin on the proliferation of human osteoblasts in vitro and the gene expression of LRP5 and Runx2, and to investigate the possible mechanism of rosuvastatin in bone metabolism. **Methods** First, osteoblasts were cultured in vitro and identified. Different concentrations ( $0$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ , and  $10^{-9}$  mol/L) of rosuvastatin were added to stimulate the human osteoblasts in vitro. After 24 hours, cell proliferation was detected using CCK-8 colorimetric method. The relative expression of LRP5 and Runx2 was detected using fluorescence quantitative PCR assay. **Results** Rosuvastatin significantly promoted cell proliferation ( $P < 0.05$ ), and increased the gene expression of LRP5 and Runx2 ( $P < 0.05$ ). The concentration of  $10^{-7}$  M showed the most obvious effect in proliferation and had the highest amount of gene expression. **Conclusion** Rosuvastatin can promote the proliferation of osteoblasts, which may be associated with increased expression of LRP5 and Runx2.

**Key words:** Rosuvastatin; Osteoblast; Proliferation; LRP5; Runx2

骨质疏松症目前已成为全球性的公共卫生问题之一, 大多数治疗骨质疏松的药物是通过抑制骨吸收发挥作用, 临床上用于促进骨形成的药物为数极少。研究表明他汀类药物可通过多种途径刺激体外培养的成骨细胞增殖和分化、增加骨密度、减少骨折发生的危险, 但其机制仍在探索中。瑞舒伐他汀是第三代 HMG-CoA 还原酶抑制剂, 目前广泛应用于临床。本研究通过观察不同浓度的瑞舒伐他汀对体外培养的人成骨细胞增殖及 LRP5、Runx2 基因表达

的影响, 探讨瑞舒伐他汀影响骨代谢可能的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

成年男性髂骨松质骨 (由山西医科大学第二临床医学院骨科手术室提供)、瑞舒伐他汀钙片 (阿斯利康制药有限公司)、DMEM-F12 (1:1) 培养基、标准胎牛血清、胰蛋白酶、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒、SABC 试剂盒 (武汉博士德)、碱性磷酸酶染液 (南京建成)、Trizol RNA 提取试剂盒 (上海生工)、

\*通讯作者: 董进, Email: SDYYDJ@medmail.com.cn

寡核苷酸引物、dNTP、PCR marker (宝生物工程)、DNA 聚合酶、引物(上海生工)、RT-PCR 试剂盒(大连宝生物)。

1.2 实验方法

1.2.1 人成骨细胞的取材和培养:骨科手术中取中年男性的髌骨松质骨,剔除软组织,生理盐水反复冲洗骨质,冲洗液澄清后,用 PBS 液冲洗摇荡 3 遍,剪成 1 mm<sup>3</sup> 的碎片,采用酶消化法分离并纯化成骨细胞。将其接种于 30 ml 的培养瓶中置于 37℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中。2d 后换液并清除未贴壁的细胞,以后每 3 d 换液 1 次,倒置显微镜下观察。待原代细胞融合成单层后,用 2.5 g/L 的胰酶消化、传代。

1.2.2 成骨细胞的鉴定:(1)成骨细胞形态观察:每日倒置显微镜下观察细胞生长。(2)取生长良好第 3 代细胞爬片,待细胞长满盖玻片后,用 PBS 液进行冲洗,95% 乙醇固定,行碱性磷酸酶( ALP )染色;取第 5 代培养细胞进行骨钙素免疫组化染色鉴定。

1.2.3 瑞舒伐他汀对成骨细胞增殖能力的测定(CCK-8 比色法):CCK-8 比色法测定成骨细胞增殖率:取对数期生长良好的成骨细胞,以 2 × 10<sup>5</sup>/ml 密度接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μl,放置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育,24 h 细胞贴壁后,瑞舒伐他汀浓度分别为 0 mol/L(对照组)、10<sup>-6</sup> mol/L、10<sup>-7</sup> mol/L、10<sup>-8</sup> mol/L、10<sup>-9</sup> mol/L 对细胞进行处理,每组设 6 个复孔。作用 24 h 后,分别在所需检测的培养孔内每孔加入 10 μl CCK-8 溶液,在细胞培养箱内继续孵育 1 h,测定 450 nm 处各孔吸光度值(OD 值)。

1.2.4 瑞舒伐他汀对成骨细胞 LRP5、Runx2 基因表达的检测:取 5 瓶生长达 70 ~ 80% 的成骨细胞,不同剂量的瑞舒伐他汀(0、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-9</sup> mol/L)分别作用于细胞,24 h 后弃去培养液,运用 Trizol 法分别提取总 RNA 后,荧光定量 PCR 法检测基因的相对表达。

(1)cDNA 第一链合成:参照试剂盒说明。

(2)PCR 的步骤:PCR 扩增 LRP5 及 Runx2,同时扩增 human-actin 内参。引物序列见表 1。反应体系:共 20 μl, FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)10 μl,上下游引物各 0.5 μl,cDNA 2 μl,无 DNase 和 RNase 的水 7 μl。反应条件:94℃ 预变性 10 min,活化 Tag 酶;94℃ 15 s,60℃ 60 s,45 个循环结束。

表 1 基因引物序列

Table 1 The sequence of gene primers

| 基因          | 上游引物                       | 下游引物                       |
|-------------|----------------------------|----------------------------|
| Gene        | Upstream primer            | Downstream primer          |
| human-actin | 5'-agagctacgagctgctgac-3'  | 5'-agcactgtgttgccgtacag-3' |
| LRP5        | 5'-gttcggctgcagcagtlaca-3' | 5'-gtccatcacgaagtcagggt-3' |
| Runx2       | 5'-ttacttacccccgccagtc-3'  | 5'-tatggagtgcctggtctg-3'   |

(3)PCR 产物鉴定与分析:内参基因和目的基因熔解曲线尖峰在同一轴上,未见杂峰,说明引物与模板特异性结合,所测 CT 值有意义。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法<sup>[1]</sup> 计算基因的相对表达,Ct 值是荧光达到荧光阈值的循环数,ΔΔCt = (目的基因 Ct 值-管家基因 Ct 值)待测样本-(目的基因 Ct 值-管家基因 Ct 值)校正样本,校正样本是被选作代表 1 倍基因表达量的样本。以上实验重复 3 次,每组设 3 孔重复。

1.2.5 统计学处理:实验所得数据用均数 ± 标准差表示,应用 SPSS17.0 进行分析。各组总体上有无差别采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法分析,P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成骨细胞的鉴定

2.1.1 成骨细胞倒置显微镜观察:原代细胞培养 3 d 后贴壁,梭形、多角形多见,12 ~ 15 d 左右单层铺满瓶壁。传代细胞多为梭形或三角形,细胞核大,有多种突起,胞浆内可见黑色颗粒。

2.1.2 第 3 代细胞碱性磷酸酶染色阳性率达 50 ~ 90%,酶活性部位呈黑色细颗粒分布于胞浆,细胞核阴性。第 5 代细胞骨钙素免疫组化染色细胞呈阳性反应,胞浆可见棕黄色颗粒状物质。以上特点均可证实培养细胞为成骨细胞。

2.2 瑞舒伐他汀对成骨细胞增殖的影响(CCK-8 比色法)

不同剂量的瑞舒伐他汀(0、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-9</sup> mol/l)作用于成骨细胞 24 h 后,显微镜下观察成骨细胞数量明显增加,各组 OD 值增加,10<sup>-7</sup> M 增殖最明显。对照组与实验组、实验各组间比较差异均有统计学意义。(见表 2)

2.3 瑞舒伐他汀对成骨细胞中 LRP5、Runx2 基因表达的影响

结果显示:不同浓度的瑞舒伐他汀作用于成骨细胞 24 h 后,LRP5、Runx2 基因表达相对增加,以 10<sup>-7</sup> M 表达最高。对照组与实组、实验组各组间比较均有统计学意义(P < 0.05)。

表 2 不同剂量的瑞舒伐他汀对成骨细胞增殖的影响

Table 2 Effect of different concentrations of rosuvastatin on the proliferation of osteoblasts

| 剂量 Dose (mol/L)  | OD 值 Optical density |
|------------------|----------------------|
| 0                | 0.1815 ± 0.005       |
| 10 <sup>-9</sup> | 0.2108 ± 0.004       |
| 10 <sup>-8</sup> | 0.2405 ± 0.007       |
| 10 <sup>-7</sup> | 0.2813 ± 0.009       |
| 10 <sup>-6</sup> | 0.2603 ± 0.005       |

注:0 为对照组,余为实验组

Note: 0 represents the control group, the rest represent the experimental groups

表 3 不同剂量的瑞舒伐他汀对成骨细胞 LRP5、Runx2 基因表达的影响

Table 3 Effect of different concentrations of rosuvastatin on the gene expression of LRP5 and Runx2 in osteoblasts.

| 剂量 Dose (mol/l)  | LRP5            | Runx2           |
|------------------|-----------------|-----------------|
| 0                | 1               | 1               |
| 10 <sup>-9</sup> | 1.2754 ± 0.07   | 1.2973 ± 0.0597 |
| 10 <sup>-8</sup> | 1.4528 ± 0.0528 | 1.9991 ± 0.0967 |
| 10 <sup>-7</sup> | 2.4249 ± 0.0607 | 2.7662 ± 0.111  |
| 10 <sup>-6</sup> | 1.6863 ± 0.0833 | 1.711 ± 0.2559  |

注:0 为对照组,余为实验组

Note: 0 represents the control group, the rest represent the experimental groups

3 讨论

骨折是骨质疏松症最严重的终末事件,严重危害人类健康。我国已进入老龄化社会,骨质疏松症的发病率也逐年增加,防治骨质疏松无疑是值得重视的问题。正常成人骨代谢的主要形式是骨重建。骨重建主要由成骨细胞与破骨细胞共同完成,体内骨转化的稳态一旦被打破,就会形成骨质疏松。目前临床上治疗骨质疏松症的药物多以骨吸收抑制剂(以 OC 为靶点)为主。实践表明,骨吸收抑制剂在一定程度上只能减少骨量丢失,不能有效的促进骨形成、真正改善骨质量,更不能解除骨疼痛及骨折这两个最影响患者生活质量的危害因素。所以,促进骨形成药物的应用尤为重要。他汀类药物被称为最具潜力的促进骨形成的药物<sup>[2,3]</sup>,Mundy<sup>[4]</sup>等首次发现他汀类药物可激活成骨细胞,促进骨形成。Meier<sup>[5]</sup>、Wang<sup>[6]</sup>等多项回顾性分析和调查结果表明,他汀类药物可增加骨密度、降低骨折发生的危险性。另有研究发现,他汀类药物可提高体外培养的新生小鼠颅盖骨成骨细胞的数量与新骨生成骨,同时其成骨作用临床试验已证实。也有研究者<sup>[7,8]</sup>证实了他汀类药物同时有抑制骨吸收的作用。但由于

实验的设计和不同他汀类药物特性的不同,少数学者未得出上述相同的结论。

本实验从分子水平上对瑞舒伐他汀促骨形成作用进行了研究。通过给予不同剂量的瑞舒伐他汀刺激体外培养的人成骨细胞 24h,结果显示瑞舒伐他汀可明显促进成骨细胞增殖、促进成骨细胞 LRP5、Runx2 基因的表达,10<sup>-7</sup>M 增殖最明显,基因的相对表达水平最高。根据这一结果推测瑞舒伐他汀可促进成骨细胞的增殖,这一机制可能与 LRP5、Runx2 基因表达增加有关。

低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 (LRP5) 是一种细胞膜表面蛋白,是低密度脂蛋白受体 (LDL) 家族成员之一。近年来,LRP5 成为影响骨代谢和骨量累积的重要基因。Gong<sup>[9]</sup>等确定 LRP5 是骨质疏松症-假神经胶质瘤综合征 (OPPG) 的致病基因并证实 LRP5 在成骨细胞表达。Kato<sup>[10]</sup>等发现 LRP5 突变小鼠的骨密度显著低于同龄野生型对照组,其骨形成率相对对照组的下降 25%,单位面积成骨细胞数量明显降低并伴有功能缺陷,而破骨细胞相关参数无明显差异。LRP5 基因与 LRP5 相关的信号途径对成骨细胞分化、增殖和功能进行调控<sup>[10]</sup>。LRP5 的作用机制与 Wnt 信号转导通路有关,Wnt 与 LRP5、Fz 蛋白形成复合物,激活下游信号后引起 β-粘连素稳定性增加,促使它转运至核内与 Lef1/Tcf<sup>[11,10]</sup>转录因子结合从而影响基因表达,调节细胞各种活动。临床研究表明,出生后如果仅 LRP5 单独缺乏,就可导致骨质疏松;LRP5 失活性突变的病人可引起骨密度降低,且骨密度降低的程度轻重不一<sup>[12]</sup>。因此,进行 LRP5 信号转导药物的调节可积极影响峰值骨密度,防治骨质疏松。

Runx2 是间充质干细胞向成骨细胞分化的特异性转录因子<sup>[13]</sup>,对于一些已经分化的细胞也能促进其向成骨表型分化<sup>[14]</sup>,Runx2 能调节多种成骨细胞增殖分化特异性标志物的表达<sup>[15]</sup>,在骨代谢调控和骨形成方面起重要作用。体内外众多实验表明,Runx2 是成骨细胞分化和骨发育的关键基因,它通过多种信号转导通路和多种调节蛋白影响成骨细胞的分化增殖。其中 Wnt/LRP5/β-Catenin 信号通路通过激活 Runx2 的表达进而调节成骨细胞发育和骨质形成<sup>[16]</sup>。Runx2 对成骨细胞定向分化的调控已广为认识,但 Runx2 基因表达的调控及其诱导成骨细胞的分子机制有待进一步探索,这将有利于人们用药物主动调节其表达以刺激骨的形成来治疗骨代谢疾病如骨质疏松症。

综上所述,成骨细胞的增殖受多种信号途径和相关因子的作用与影响,药物对其作用的分子机理还需要更深入的研究。本实验初步证实了瑞舒伐他汀可以促进骨形成,其机制可能与 LRP5、Runx2 基因的表达增加有关。但基础研究只能为临床应用提供一定的理论依据,他汀类药物应用于骨疾病的一大缺陷是药物的代谢动力学,研究表明其在动物体内增加骨密度的剂量远大于人体正常的口服调脂剂量。瑞舒伐他汀的血浆蛋白结合率高达 90%,主要经肝脏代谢,如果通过加大剂量提高其对骨组织的作用,会给肝脏、肌肉组织及其它组织器官带来严重的不良反应。所以,改进药物的化学结构性质,早日研制出对骨骼亲和力高、具有显著作用的他汀类药物及高利用率的给药途径是其能够应用于治疗骨质疏松、促进骨折愈合的关键。

【 参 考 文 献 】

[ 1 ] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [ J ]. Nucl Acids Res. 2001, 29: 2002-2007.

[ 2 ] Faber D. Cholesterol drugs show promise as bone builders [ J ]. Science, 288 ( 5475 ): 2297-2298.

[ 3 ] Steven R, Douglas C, et al. Do statins prevent both cardiovascular disease and fracture? [ J ] JAMA, 2000, 283 ( 24 ): 3255-3257.

[ 4 ] Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins ( see comments ) [ J ]. Science, 1999, 286 ( 5446 ): 1946-1949.

[ 5 ] Meier CR, Schlienger RG, Kraenzlin ME, et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of fractures [ J ]. JAMA, 2000, 283 ( 24 ): 3205-3210.

[ 6 ] Wang PS, Solomon DH, Mogun H, et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients [ J ]. JAMA, 2000, 283 ( 24 ): 3211-3216.

[ 7 ] Staal A, Frith JC, French MH, et al. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity [ J ]. Bone Miner Res, 2003, 18 ( 1 ): 88-96.

[ 8 ] Liu B, Yu SF, Pang SZ. Effect of simvastatin on the osteoclastic resorption and bone anabolism with murine calvarial organ culture in vitro [ J ]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2005, 11 ( 3 ): 351-355.

[ 9 ] Gong YQ; Roger B; Fukai SN, et al. LDL receptor-related protein 5 ( LRP5 ) affects bone accrual and eye development [ J ]. Cell, 2001, 107 ( 4 ): 513-523.

[ 10 ] Kato M; Millan S; Levasseur PR, et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in LRP5, a Wnt coreceptor [ J ]. J Cell biology, 2002, 157 ( 2 ): 303-314.

[ 11 ] He X, Semenov M, Tamai K, et al. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt  $\beta$ -catenin signaling : Arrows point the way [ J ]. Development, 2004, 131 : 1663-1667.

[ 12 ] Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM, et al. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases [ J ]. Gene, 2004, 341 : 19-39.

[ 13 ] Dong S, Ying D, Duan X, et al. Effect of core binding factor  $\alpha$ 1 on the expression of osteoblast gene marker mesenchymal stem cells [ J ]. Chinese journal of reparative and reconstructive surgery. 2005 ( 09 ): 746-750.

[ 14 ] Gersbach CA, Byers BA, Pavlath GK, et al. Runx2/Cbfa1 stimulates transdifferentiation of primary skeletal myoblasts into a mineralizing osteoblastic phenotype [ J ]. Experimental cell research, 2004, 300 ( 02 ): 406-417.

[ 15 ] Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, et al. Runx2 control of organization assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression [ J ]. Oncogene, 2004, 23 : 4315-4329.

[ 16 ] Gaur T, Lengner C J, Hovhannisyan H, et al. Canonical Wnt signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression [ J ]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280 ( 39 ): 331 32-40.

( 收稿日期: 2013-01-16 )

作者:

[谭璐](#), [董进](#), [TAN Lu](#), [DONG Jin](#)

作者单位:

[谭璐, TAN Lu \(山西医科大学2010级内分泌科硕士研究生, 山西太原, 030001\)](#), [董进, DONG Jin \(山西医科大学第一临床医学院内分泌科, 山西太原, 030001\)](#)

刊名:

[中国骨质疏松杂志](#)

ISTIC

英文刊名:

[Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年, 卷(期):

[2012\(11\)](#)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zggzsszz201311003.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201311003.aspx)