

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)23-2175-04

辛伐他汀对人骨髓基质细胞 Cbfa1 ,Cbfb 和 Osterix 表达的影响

余向前, 张柳, 蔡俊 (华北煤炭医学院附属医院骨外科, 河北唐山 063000)

Effects of simvastatin on Cbfa1 , Cbfb and Osterix expressions in human bone marrow stromal cells

YU Xiang-Qian , ZHANG Liu , CAI Jun

Department of Orthopaedic Surgery , Affiliated Hospital , North China Coal Medical College , Tangshan 063000 , China

【Abstract】 AIM : To study the effects of simvastatin on osteoblastic differentiation and proliferation of human bone marrow stromal cells (hBMSC), and investigate the mechanism of the effects of simvastatin on hBMSC. **METHODS** : hBMSC derived from patients with femur fracture were cultured *in vitro*. After subculturing , the medium of treatment group were added 10^{-7} mol/L simvastatin. Semi-quantitative RT-PCR was performed for evaluating the expressions of Cbfa1 , Cbfb and Osterix (OSX) mRNA. Cellular alkaline activity and mineralization were examined by ALP measurement kit and Alizarin Red-S staining. Cell Count Kit-8 (CCK-8) was used to examine proliferation. **RESULTS** : The expressions of Cbfa1 and OSX mRNA in treatment group were higher than those of the control group at 3 , 6 , 9 , 12 d ($P < 0.01$) , but no significant effects were observed on the expression of Cbfb mRNA in both groups ($P > 0.05$) ; The activity of ALP in treatment group was higher than that of the control group at 3 d (54.05 ± 1.14 vs 63.54 ± 2.99 , $P < 0.05$) , 6 d (60.53 ± 3.08 vs 70.39 ± 3.98 , $P < 0.01$) , 9 d (72.93 ± 0.85 vs 86.28 ± 1.20 , $P < 0.01$) , 12 d (74.13 ± 1.79 vs 94.99 ± 3.20 , $P < 0.01$) ; Simvastatin enhanced osteoblast-mediated mineralization ; Compared with control group , the proliferation of hBMSC was inhibited in treatment group ($P < 0.05$). **CONCLUSION** : Simvastatin can promote osteoblastic differentiation and inhibit the proliferation of hBMSC by increasing the expressions of Cbfa1 , OSX mRNA.

【Keywords】 simvastatin ; bone marrow stromal cells ; osteoblasts ; cell differentiation ; gene expression

【摘要】目的 : 通过对成人骨髓基质细胞(hBMSC)体外培

收稿日期 2006-02-20 ; 接受日期 2006-08-24

基金项目 河北省自然科学基金(C2006000580)

通讯作者 张柳. Tel (0315) 3725973 Email zhliu123@sohu.com

作者简介 : 余向前. 硕士生(导师张柳). Tel (0315) 3725986

Email yxq5151@163.com

养的观察, 研究辛伐他汀(SIM)对 hBMSC 成骨分化、增殖的影响和作用机制. 方法 : 取人髓腔内骨髓, 采用全骨髓培养法进行原代和传代培养. 传代后实验组添加 10^{-7} mol/L 的 SIM , 同时做不加药的空白对照. 应用半定量 RT-PCR 方法分别检测核心结合因子 $\alpha 1$ (Cbfa1)、 β (Cbfb) 和 Osterix (OSX) 在成骨细胞分化过程中的表达 ; 应用碱性磷酸酶 (ALP) 检测试剂盒及茜素红法检测细胞 ALP 比活性和细胞矿化能力 ; 应用 CCK-8 测定细胞增殖情况. 结果 : SIM 作用后第 3、6、9 和 12 日的 Cbfa1 和 OSX 表达均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) , Cbfb 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ; 与对照组相比, SIM 作用后的第 3 日 [63.54 ± 2.99] vs [54.05 ± 1.14] , ($P < 0.05$) ; 第 6 日 [70.39 ± 3.98] vs [60.53 ± 3.08] , ($P < 0.01$) ; 第 9 日 [86.28 ± 1.20] vs [72.93 ± 0.85] , ($P < 0.01$) ; 第 12 日 [94.99 ± 3.20] vs [74.13 ± 1.79] , ($P < 0.01$) , ALP 比活性高于对照组. SIM 能增强形成钙结节的能力并抑制细胞增殖 ($P < 0.05$). 结论 : SIM 通过促进成骨细胞相关基因的表达从而促进 hBMSC 成骨分化, 同时具有抑制细胞增殖的作用.

【关键词】 辛伐他汀 ; 骨髓基质细胞 ; 成骨细胞 ; 细胞分化 ; 基因表达

【中图分类号】 R392.2 ; R972 **【文献标识码】** A

0 引言

骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells , BMSC) 具有自我增生及多向分化潜能, 在适当诱导条件下可以向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、网状细胞和肌细胞等多种细胞分化^[1]. 有研究报道治疗高脂血症的他汀类药物可以治疗骨质疏松并能促进骨形成^[2]. Maeda 等^[3]发现辛伐他汀(simvastatin , SIM) 可增强非变形的成骨细胞(MC3T3-E1) 的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase , ALP) 活性和细胞外基质矿化, 但是作用机制尚不清楚. 以往的实验常使用动物的 BMSC , 但由于存在种属的局限, 与人类的 BMSC 具有较大的差异. 本实验直接采用人骨髓基质细胞(human bone marrow stromal cells , hBMSC) , 通过添加特定浓度的 SIM , 观察其对 hBMSC 成骨分化及增殖的影响, 通过对比分析核心结合因子 $\alpha 1$ (core binding factor alpha 1 , Cbfa1) , 核心结合因子 β (core binding factor beta , Cbfb) 和 Osterix (OSX) 在成骨细胞分化过程中的表达以探讨 SIM 促进骨形成的作用

机制。

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因需行髓内钉固定而扩髓患者髓腔内骨髓(男3,女3)例,年龄35~56(平均49.8)岁,患者术前检查无代谢性骨骼疾病及他汀类药物服用史。DMEM高糖培养基(美国GIBCO公司);胎牛血清(天津TBD公司); β -甘油磷酸钠、维生素C(美国SIGMA公司);SIM(美国MERCK公司);茜素红(美国AMRESCO公司);Trizol(美国INVITROGEN公司);CCK-8(日本同仁化学研究所);M-MLV逆转录试剂盒(加拿大BBI公司);Taq DNA聚合酶(美国PROMEGA公司);碱性磷酸酶检测试剂盒、考马斯亮兰蛋白测定试剂盒购自南京建成生物制品有限公司;引物由上海SANGON公司合成。

1.2 方法

1.2.1 hBMSC的细胞培养 注射器肝素化后抽取3~5 mL骨髓。将所取骨髓经100目钼网过滤后,离心去除上层脂肪,取沉淀细胞加入适量DMEM,采用全骨髓培养法以 $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 接种于培养瓶中,加入完全培养液(含青霉素、链霉素和100 mL/L的胎牛血清,普通高糖DMEM)置37℃含体积分数50 mL/L CO₂的湿化气孵育箱行原代培养^[4]。48 h后半量换液,以后每3 d全量换液,红细胞不贴壁死亡或随换液弃去,原代培养至第12日细胞汇合成单层后传代,细胞计数后接种于培养瓶或培养板中,实验组采用含有 10^{-7} mol/L SIM(SIM溶于乙醇)的条件培养液,对照组用完全培养液(含有与实验组所加入SIM等量乙醇)。

1.2.2 成骨细胞分化相关基因表达的检测 取所有6例经培养后的hBMSC在SIM作用后的第3、6、9和12日,采用Trizol一步法提取细胞总RNA,RNA定量后取2 μg 总RNA,M-MLV反转录试剂盒进行反转录。反转录后取2.5 μL cDNA作为模板进行PCR。PCR反应体系:10 \times buffer 2.5 μL ,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL ,25 mmol/L dNTP 0.5 μL ,引物(25 $\mu\text{mol/L}$)各1 μL ,Taq酶0.25 μL (83.35 nkat/ μL),cDNA模板2.5 μL ,DEPC水补足至总体积25 μL 。PCR引物的序列:Cbfa1上游引物:tatccagccaccttacttac,Cbfa1下游引物:ttccatcagcgtcaacac(产物316 bp);Cbfb上游引物:gatcatgagcccttttctcc,Cbfb下游引物:ggcaaaag-caatctggtagc(产物175 bp);OSX上游引物:gcagctagaagggagtgggtg,OSX下游引物:gcaggcaggtgaact-

tcttc(产物359 bp); β -actin的上游引物 atcatgttgagc-cttcaa, β -actin下游引物 catctcttgctcgaagtcca(产物310 bp)。PCR反应条件:94℃ 4 min,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 60 s,35个循环后72℃延伸10 min,循环结束后取扩增产物于琼脂糖凝胶(含0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭)电泳,将凝胶置于凝胶成像分析系统中检测各基因条带的吸光度值并求出与内参照基因 β -actin的吸光度比值。

1.2.3 ALP比活性的检测 传代细胞以 5×10^4 /孔细胞接种于24孔培养板内,分别于SIM作用后的第3、6、9和12日检测细胞的ALP活性。收集细胞,行超声处理,4℃离心,10 000 g ,10 min,取上清,ALP检测试剂盒检测细胞ALP活性,考马斯亮兰蛋白测定试剂盒定量蛋白含量,ALP活性与蛋白含量的比值为ALP比活性,单位为nkat/(L·g)。

1.2.4 细胞形成钙结节能力检测 培养皿中细胞PBS冲洗2次,750 mL/L冷乙醇固定30 min,风干后用40 mmol/L的茜素红染色1 h,蒸馏水冲洗。

1.2.5 SIM对细胞增殖的影响 将消化所得细胞以 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 密度接种于96孔培养板,每组30孔,每孔培养基总量为100 μL ,次日起每天选择6孔细胞,连续测5 d,每孔加入CCK-8溶液10 μL ,37℃孵育4 h停止,在酶联免疫检测仪上测定每孔的A值(波长450 nm,参比波长655 nm)。

统计学处理:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 11.0进行配对 t 检验对组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓基质细胞形态学观测 倒置相差显微镜下,刚接种的骨髓中可见大的单核细胞,8~10 h后细胞开始贴壁,24 h后少数细胞变形,呈长梭形,体积较大,以后贴壁细胞开始成克隆样生长并向三角形、多边形分化,部分区域细胞形成团簇。细胞接种早期培养液中悬浮大量的血细胞,随培养时间延长,不贴壁的血细胞逐渐死亡或随换液弃去,8~10 d细胞融会至80%。

2.2 SIM对Cbfa1,OSX和Cbfb mRNA表达的影响 在SIM作用后的3、6、9和12日检测成骨细胞转录因子mRNA的表达情况发现,实验组Cbfa1 mRNA,OSX mRNA在各时间点的表达均明显增加($P < 0.01$)并且这种差异随SIM作用时间增加而增强,实验组与对照组Cbfb mRNA差异无统计学意义($P > 0.05$,表1)。

表1 实验组与对照组 Cbfa1, Cbfb 和 OSX mRNA 表达的差异

(n=6, $\bar{x} \pm s$)

时间(d)	Cbfa1 mRNA		Cbfb mRNA		OSX mRNA	
	对照	实验	对照	实验	对照	实验
3	1.40 ± 0.22	2.70 ± 0.22 ^b	0.59 ± 0.07	0.95 ± 0.26	0.93 ± 0.02	1.22 ± 0.07 ^b
6	2.22 ± 0.16	3.14 ± 0.10 ^b	1.18 ± 0.09	1.01 ± 0.09	1.17 ± 0.06	1.50 ± 0.03 ^b
9	2.48 ± 0.06	3.45 ± 0.08 ^b	1.25 ± 0.18	1.19 ± 0.11	2.59 ± 0.34	3.39 ± 0.41 ^b
12	1.97 ± 0.09	3.49 ± 0.10 ^b	1.02 ± 0.05	1.29 ± 0.10	2.03 ± 0.07	2.41 ± 0.17 ^b

^bP < 0.01 vs 对照.

2.3 SIM 对 ALP 比活性的影响 在 SIM 作用后的 3, 6, 9 和 12 日实验组与同一时间点对照组相比 ALP 比活性均高于对照组 (P < 0.05, P < 0.01 表 2).

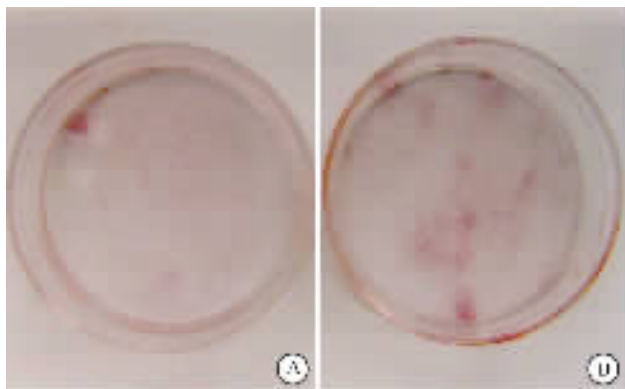
表2 实验组与对照组 ALP 比活性的差异

[n=6, $\mu\text{kat}/(\text{L} \cdot \text{g})$, $\bar{x} \pm s$]

组别	3 d	6 d	9 d	12 d
对照	54.05 ± 1.14	60.53 ± 3.08	72.93 ± 0.85	74.13 ± 1.79
实验	63.54 ± 2.99 ^a	70.39 ± 3.98 ^b	86.28 ± 1.20 ^b	94.99 ± 3.20 ^b

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 对照.

2.4 细胞形成钙结节能力 实验组可见大量散在的橘红色钙结节, 为茜素红与钙盐形成的橘红色复合物, 对照组仅为大片模糊的橘红色, 无钙结节形成 (图 1).



A 对照组; B 实验组.

图1 茜素红染色检测细胞形成钙结节能力

2.5 细胞增殖 与对照组比较, 从 SIM 作用后 3 d 开始实验组细胞数明显低于对照组 (P < 0.05), 提示 SIM 具有抑制成骨细胞增殖的作用 (图 2).

3 讨论

近年来临床回顾性研究发现, 他汀类药物作为治疗高脂血症的一类药物具有治疗骨质疏松, 降低股骨颈骨折发生率的作用^[5-6]. 有实验证实 SIM 可减少

大鼠由于卵巢切除后所引起的松质骨丢失, 同时可提高皮质骨形成^[7]. 本实验中实验组 ALP 的比活性和细胞外形成钙结节的能力都明显强于对照组, 说明 SIM 能够显著增加体外培养的 hBMSC 的 ALP 比活性和细胞矿化能力, 促进 hBMSC 成骨分化.

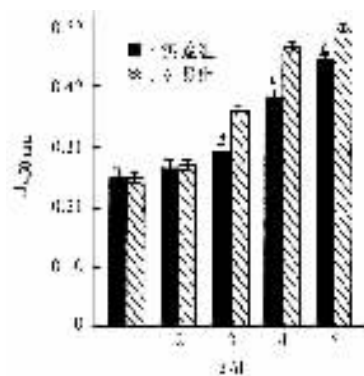
^aP < 0.05 vs 对照组.

图2 SIM 对细胞增殖的影响

我们在实验中发现 10^{-7} mol/L SIM 能够促进成骨细胞相关因子 Cbfa1, OSX mRNA 的表达, 且此作用随作用时间的延长而增强, 而对 Cbfb mRNA 的表达没有影响. Cbfa1 是成骨特异性转录激活因子, Cbfa1 可诱导成骨细胞分化与骨形成^[8-9]. OSX 则是成骨细胞分化和骨形成所必需的转录因子^[10], 其表达需要 Cbfa1 的存在^[11]. Cbfa1 与 DNA 的结合以及 Cbfa1 依赖的转录激活需要 Cbfb 的参与^[12]. 由此我们得出 SIM 促进成骨细胞相关因子 Cbfa1, OSX mRNA 而不是 Cbfb mRNA 的表达, 在转录水平提高细胞外基质蛋白的表达, 从而促进 hBMSC 成骨分化.

同时, 我们还发现 SIM 具有抑制成骨细胞增殖的作用. 但作用机制尚不十分清楚, 这可能与 SIM 降低骨祖细胞增殖率有关^[13]. 我们认为 SIM 能够促进体外培养的 hBMSC 的成骨分化, 同时抑制其增殖, 但是相对于促进骨形成减少骨量丢失的作用来说, 其促分化作用是显著的, 而抑制增殖的作用则是微不足道的. SIM 促进成骨细胞分化的作用是否还通过其他

的途径以及 SIM 对 Cbfa1 和 OSX 的蛋白活性是否也有影响还有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143 - 147.
- [2] Rejnmark L, Buus NH, Vestergaard P, et al. Effects of simvastatin on bone turnover and BMD: A 1-year randomized controlled trial in postmenopausal osteopenic women[J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(5): 737 - 744.
- [3] Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, et al. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 280(3): 874 - 877.
- [4] 曹 罡, 毛天球, 席 庆 等. 人骨髓基质干细胞体外培养的生物特性[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(3): 207 - 209.
- [5] Chan KA, Andrade SE, Boles M, et al. Inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and risk of fracture among older women[J]. Lancet, 2000, 355(9222): 2185 - 2188.
- [6] Pytlík M, Janiec W, Misiarz-Myrta M, et al. Effects of simvastatin on the development of osteopenia caused by ovariectomy in rats[J]. Pol J Pharmacol, 2003, 55(1): 63 - 71.

- [7] Oxlund H, Andreassen TT. Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy induced bone loss while increasing cortical bone formation[J]. Bone, 2004, 34(4): 609 - 618.
- [8] Zheng H, Guo Z, Ma Q, et al. Cbfa1/ost2 transduced bone marrow stromal cells facilitate bone formation *in vitro* and *in vivo*[J]. Calcif Tissue Int, 2004, 74(2): 194 - 203.
- [9] Gersbach CA, Byers BA, Pavlath GK, et al. Runx2/Cbfa1 stimulates transdifferentiation of primary skeletal myoblasts into a mineralizing osteoblastic phenotype[J]. Exp Cell Res, 2004, 300(2): 406 - 417.
- [10] Nakashima K, Xin Z, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation[J]. Cell, 2002, 108(1): 17 - 29.
- [11] Komori T. Functions of BMPs, Runx2, and osterix in the development of bone and cartilage[J]. Nippon Rinsho, 2005, 63(9): 1671 - 1677.
- [12] Komori T. Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development[J]. J Bone Miner Metab, 2003, 21(4): 193 - 197.
- [13] Baek KH, Lee WY, Oh KW, et al. The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells[J]. J Korean Med Sci, 2005, 20(3): 438 - 444.

编辑 杨湘华

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)23-2178-01

亚临床甲减患者血高敏 C 反应蛋白测定

陈 冬

(华北煤炭医学院附属医院内分泌科, 河北 唐山 063000)

【关键词】亚临床甲减, 高敏 C 反应蛋白

【中图分类号】R581.2 【文献标识码】B

1 临床资料 亚临床甲减、甲减患者各 20 例, 甲状腺 ECT 及 B 超排除甲状腺炎、甲状腺结节、甲状腺腺瘤、甲状腺癌、垂体性及其他恶性肿瘤引起的甲状腺疾病。近 1 a 内无生育史, 无心脑血管疾病, 无糖尿病, 无炎症, 外伤, 未服用避孕药、降脂药、β-阻断剂等。①亚临床甲减组, 女性 20 例, 年龄 43.95 ± 6.76 岁。②甲减组, 女性 20 例, 年龄 42.70 ± 6.47 岁。③选取门诊体检健康, 甲状腺功能正常对照组, 女性 20 例, 年龄 45.20 ± 6.16 岁。3 组年龄、性别相匹配。采用酶联免疫法 (Herrenberg 德国) 检测患者的高敏 C 反应蛋白水平。结果使用 SPSS 11.5 统计软件处理。

2 结果和讨论 甲减组高敏 C 反应蛋白 (12.82 ± 2.31)

mg/L 较亚临床甲减组 (4.51 ± 0.87) mg/L, 甲状腺功能正常对照组 (1.94 ± 0.44) mg/L 增高, t 值分别为 14.37, 21.18, 差异存在显著性 ($P < 0.01$)。亚临床甲减组高敏 C 反应蛋白 (4.51 ± 0.87) mg/L 较甲状腺功能正常对照组 (1.94 ± 0.44) mg/L 增高, t 值为 11.37, 差异存在显著性 ($P < 0.01$)。甲减、亚临床甲减组高敏 C 反应蛋白水平较甲状腺功能正常对照组显著增高, 甲减患者甲状腺激素低减引起血清胆固醇升高, 冠心病发病率较高^[1]。CRP 是动脉粥样硬化发生的标记^[2], 能直接诱导内皮细胞产生血浆纤溶酶原激活抑制物 1 mRNA 及蛋白的表达, 并使其活性增加, 同时抑制扩血管物质一氧化氮合酶的表达和 NO 的释放^[3], 关于是否对亚临床甲减行激素替代治疗一直存在争议, 对于未治疗的亚临床甲减是否与严重的心血管后果有关, 结论尚需进一步观察。

【参考文献】

- [1] 白 耀. 甲状腺病学-基础与临床[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2004: 287 - 288.
- [2] Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. C-reactive protein: Risk marker or mediator in atherothrombosis? [J]. Hypertension, 2004, 44(1): 6 - 11.
- [3] Devaraj S, Xu DY. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: Implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis[J]. Circulation, 2003, 107(3): 398 - 404.

编辑 王小仲

收稿日期 2006-06-13; 接受日期 2006-08-19

作者简介 陈 冬, 学士, 主治医师. Tel: 13832873146 Email: cde231@sohu.com