

## • 基础研究 •

## 辛伐他汀抑制甲状旁腺素相关肽诱导的破骨细胞生成和功能

黄鲁豫, 胡蕴玉, 马真胜, 吕荣

(第四军医大学附属西京医院骨科研究所, 陕西 西安 710032)

**【摘要】** 目的: 探讨辛伐他汀对骨髓来源的破骨细胞形成和功能的影响。方法: 取 Balb/C 雄性小鼠双侧股骨和胫骨的骨髓, 以不含血清的  $\alpha$ -MEM 培养液洗涤并收集骨髓细胞, 再将细胞重新悬浮于含 100 ml/L 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养液中, 细胞计数后, 配成  $1.5 \times 10^9$  /L 的细胞悬液, 同时加入甲状旁腺素相关肽 (PTHrP) 和不同剂量的辛伐他汀 ( $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L) 于 24 孔培养板进行培养, 并设阳性对照 (只加 PTHrP) 和阴性对照 (PTHrP 和辛伐他汀都不加) 组, 每组均有 1 孔放置骨磨片 1 片, 培养 6 d 后; 去除上清, 抗酒石酸 (TRAP) 染色检测培养板底部破骨细胞形成; 骨磨片用甲苯胺蓝染色, 电镜检测骨磨片的吸收陷窝。结果: 小鼠骨髓细胞在 PTHrP 的诱导下获得大量的 TRAP 染色阳性的破骨细胞, 骨磨片有吸收陷窝形成; 用辛伐他汀 ( $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$  mol/L) 和 PTHrP 共同培养下 TRAP 染色阳性的破骨细胞形成数量均明显减少 ( $P < 0.01$ ), 辛伐他汀在  $10^{-5}$  mol/L 时则无 TRAP 染色阳性的破骨细胞形成; 辛伐他汀在  $10^{-7}$  mol/L 时骨磨片有吸收陷窝的形成但少于阳性对照组 ( $P < 0.01$ ), 在  $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L 时骨磨片则无吸收陷窝的形成。结论: 辛伐他汀对小鼠骨髓来源的破骨细胞的形成有着明显的抑制作用, 并且呈剂量依赖关系。

**【关键词】** 破骨细胞; 辛伐他汀; 细胞培养

**Inhibition of simvastatin on osteoclast formation and function induced by PTHrP** HUANG Luyu, HU Yun-yu, MA Zhen-sheng, LÜ Rong. Institute of Orthopaedics and Traumatology, Xijing Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shanxi, China

**ABSTRACT Objective** To evaluate the effect of simvastatin on the osteoclast formation and function by source of bone marrow. **Methods** Bilateral femoral and tibial bone marrow of Balb/C male mice were taken and cultured with  $\alpha$ -MEM nutrient solution in which no serum was contained. After washing murine primary bone marrow cells were gathered and re-suspended in the  $\alpha$ -MEM nutrient solution with 100 ml/L fetal bovine serum. The cell suspension in  $1.5 \times 10^9$  /L concentration was made after counting. Under the induction by PTHrP, the cells were cultured for 6 days in the presence of  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  mol/L simvastatin. Meanwhile, the positive and negative control group was set up. Osteoclast formation was detected by TRAP staining and its function was assessed by absorption lacuna using electron microscope. **Results** Large osteoclasts and absorption lacuna were formed under the induction of PTHrP. Osteoclast formation were partially inhibited adding in  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  mol/L simvastatin ( $P < 0.01$ ), and almost no positive osteoclast formed adding in  $10^{-5}$  mol/L simvastatin. The absorption lacuna was partially fewer adding in  $10^{-7}$  mol/L simvastatin than that of positive group ( $P < 0.01$ ), and no absorption lacuna was found at the high dose of simvastatin ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  mol/L). **Conclusions** Simvastatin has obviously inhibition to osteoclast formation and has a dose-dependence manner.

**Key words** Osteoclast; Simvastatin; Cell culture

近来大量研究发现, 他汀类药物可有效地治疗骨质疏松,

降低骨折的发病率<sup>[1, 2]</sup>, 究其机制, 多认为他汀类药物可以促进骨髓基质细胞向成骨细胞的分化, 但对破骨细胞的作用目前却很少报道。而破骨细胞是骨吸收过程的主要承担者。本研究的目的是通过 PTHrP 诱导的方法<sup>[3]</sup>建立体外破骨细胞分离培养体系, 观察辛伐他汀对破骨细胞的形成和骨吸收活

基金项目: 陕西省科技攻关项目资助课题 [编号: 2005K14-G2(1)]

通讯作者: 胡蕴玉 Tel: 029-84775292 E-mail: hwen6407@fmmu.edu.cn

动的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 主要试剂和动物** 辛伐他汀原料药,由山东鲁南制药集团提供(生产批号:050502);甲状旁腺素相关肽(PTHrP),美国 Cytolab公司;α-MEM 培养基,美国 Gibco公司;胎牛血清(FCS),Hycobn公司;抗酒石酸(TRAP)染色试剂盒,日本 Hokudo株式会社;Balb/C小鼠(清洁级)由第四军医大学动物实验中心提供。

**1.2 骨磨片的制作** 新鲜牛股骨干皮质骨 2.5%戊二醛固定,以低速锯式切片横切,手锯修成 1 cm × 1 cm × 1 cm 大小,Leica硬组织切片机制成 30 μm 厚度的薄片,100目木砂纸上打磨,梯度乙醇脱水,稀氨水超声波清洗 10 min × 3次,钴 60照射消毒。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 破骨细胞分离及培养** 出生 24 h 内的 Balb/C 小鼠 2只,脱颈处死后,75%乙醇浸泡 5 min。取双侧股骨和胫骨,清除软组织和两端骨髓,用不含血清的 α-MEM 培养液冲洗髓腔,收集骨髓细胞并用 α-MEM 培养液洗涤 2次。然后将细胞重新悬浮于含 10% 胎牛血清的 α-MEM 培养液中,细胞计数后,配成  $1.5 \times 10^6$  /L 的细胞悬液,24孔细胞培养板培养,每孔加入 0.5 ml 细胞悬液并进行分组(见 1.3.2)。分组后,培养板置于 5% CO<sub>2</sub> 的 37℃ 孵箱中进行培养。2 d 更换 1 次培养液,每次换液时,移去 0.25 ml 旧的培养液,补充等量新的培养液以及等量的 PTHrP 和辛伐他汀。

**1.3.2 分组** 共分 5组:第 1组阴性对照组(空白对照组):不加 PTHrP 和辛伐他汀,每次换液,只加培养液;第 2组阳性对照组:在开始和每次换培养液时每培养孔中加入 45 ng PTHrP;第 3、4、5组为实验组,每培养孔在开始和换培养液时加入 45 ng PTHrP 和分别加入  $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L 辛伐他汀。每次每组共设 4 个孔,每组设 1 个孔置入骨磨片 1 个。同时再做 4 个复盘作为盘间比较,计算出 5 个培养板每组破骨细胞平均数和标准差。

**1.3.3 抗酒石酸 (TRAP) 染色** 培养板中贴壁的细胞进行 TRAP 染色。培养 6 d 后,小心移去培养液,磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤后,按 TRAP 试剂盒说明书操作,首先用乙醇和丙酮 (1:1) 混合液固定 5 min 后,去离子水洗涤 3 次,然后加入缓冲液和发色基质的混合液(均为试剂盒所带),37℃ 孵箱中温育 20~60 min 见染色呈红色良好后,移去反应液,去离子水洗涤以终止反应,22~25℃ 室温过夜干燥。

## 1.4 观察项目

**1.4.1 观察破骨细胞的形成和分化的特点** 分别在第 4、6、8、14 天,用倒置显微镜观察培养孔中贴壁细胞的分化情况,并进行 TRAP 染色,观察不同时期 TRAP 染色阳性细胞的数量和形态及细胞学特征。

**1.4.2 破骨细胞计数** 将培养 6 d 的 TRAP 染色标本于倒置显微镜下,观察并对每孔计数,含 3 个以上(包括 3 个)细胞核 TRAP 染色阳性的巨大细胞均为破骨细胞。其他细胞,如巨噬细胞、成骨细胞、成纤维细胞 TRAP 染色均为阴性。

**1.4.3 破骨细胞吸收功能的测定** 培养 6 d 后,取出骨磨片,去离子水冲洗 3 遍,甲醛固定液固定,22~25℃ 室温下自

然干燥,甲苯胺蓝染色,标本喷金处理后,用扫描电镜观察骨磨片的吸收陷窝并计数。

**1.5 统计学处理** 破骨细胞计数和骨磨片的吸收陷窝计数,结果用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,SPSS 10.0 统计软件包,破骨细胞计数行 Kruskal-Wallis Test (H 检验法) 分析,各组间行 Mann-Whitney Test (秩和检验),各组间  $P < 0.05$  有统计学差异;骨磨片的吸收陷窝计数行  $t$  检验,  $P < 0.05$  有统计学差异。

## 2 结果

**2.1 破骨细胞的生长特点** 在培养初期,没有破骨细胞形成,到第 4 天时,开始出现破骨细胞,第 6~8 天时,破骨细胞数目达到高峰,以后逐渐下降,到第 14 天时,基本消失。破骨细胞的特点,TRAP 阳性的多核巨细胞,基本上有两种形态:一种是多个细胞核聚集在细胞的中心;一种是多个细胞核分布在细胞的周边部分。因为细胞核分布的不均匀性,难以清楚地区分这两种细胞形态,故在细胞计数时,均计为破骨细胞。破骨细胞大多成簇出现,而且邻近成骨细胞或基质细胞簇附近,没有观察到阳性的单核细胞。

**2.2 破骨细胞计数** 培养的第 6 天,进行各组间的 TRAP 阳性细胞计数,第 1~5 组分别为  $2.30 \pm 0.92$ 、 $116.04 \pm 11.15$ 、 $66.44 \pm 3.01$ 、 $6.08 \pm 1.74$  和  $0.60 \pm 0.40$ 。结果显示,阳性对照组,骨髓细胞在 PTHrP 的刺激下,有大量的破骨细胞形成,加入  $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$  mol/L 的辛伐他汀均明显抑制破骨细胞的形成, $10^{-5}$  mol/L 的浓度时,几乎完全抑制了 PTHrP 诱导的破骨细胞形成(见图 1~5)。5 组统计学分析,  $H = 17.85$ ,  $P \approx 0$ 。第 2、3、4、5 组间比较有显著性差异 ( $P$  均 =  $0.009 < 0.01$ )。表明辛伐他汀对 PTHrP 诱导的破骨细胞形成有着明显的抑制作用,并呈剂量依赖关系。

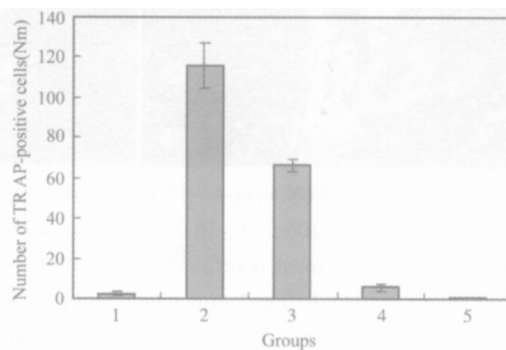


图 1 辛伐他汀对 PTHrP 诱导的破骨细胞形成的影响

Fig 1 Effect of simvastatin on osteoclast formation induced by PTHrP

**2.3 破骨细胞吸收功能的测定** 骨磨片在第 1 组(阴性对照组)和第 4、5 组(辛伐他汀  $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L 组)均无吸收陷窝形成,在第 2(阳性对照组)、3(辛伐他汀  $10^{-7}$  mol/L 组)组有吸收陷窝的形成,并且第 2 组的陷窝数目 ( $34.80 \pm 5.76$ ) 明显多于第 3 组 ( $15.40 \pm 4.82$ ),并有显著统计学差异 ( $P = 0.0004 < 0.05$ ) 见图 6~9。表明辛伐他汀对 PTHrP 诱导的破骨细胞的吸收功能有着明显的抑制作用。

## 3 讨论

从骨髓细胞中培养破骨细胞,必须加入骨吸收因子,常用

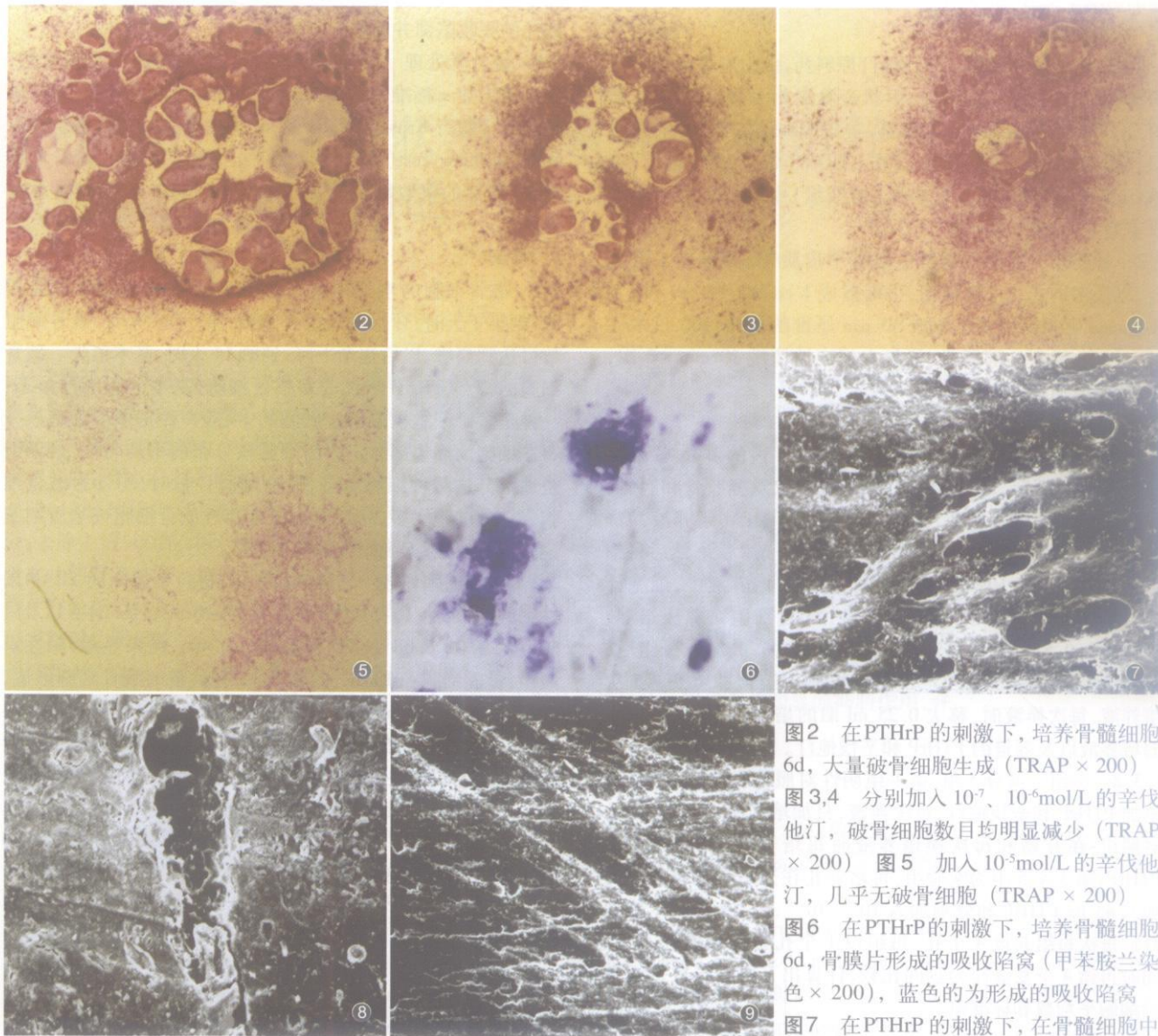


图2 在PTHrP 的刺激下,培养骨髓细胞 6d,大量破骨细胞生成 (TRAP × 200)  
 图3,4 分别加入 10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup>mol/L 的辛伐他汀,破骨细胞数目均明显减少 (TRAP × 200)  
 图5 加入 10<sup>-5</sup>mol/L 的辛伐他汀,几乎无破骨细胞 (TRAP × 200)  
 图6 在PTHrP 的刺激下,培养骨髓细胞 6d,骨膜片形成的吸收陷窝 (甲苯胺兰染色 × 200), 蓝色的为形成的吸收陷窝  
 图7 在PTHrP 的刺激下,在骨髓细胞中

培养 6d, 骨膜片形成的吸收陷窝 (扫描电镜照片 × 100) 图8 加入 10<sup>-7</sup>mol/L 的辛伐他汀,骨磨片形成的吸收陷窝明显减少 (扫描电镜照片 × 300, 100μm) 图9 加入 10<sup>-6</sup>mol/L 的辛伐他汀,骨磨片均无吸收陷窝形成 (扫描电镜照片 × 100)

**Fig.2** Large osteoclasts formed, bone marrow was cultured 6 days under stimulation of PTHrP (TRAP × 200) **Fig.3,4** Osteoclast obviously decreased adding in 10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup>mol/L simvastatin respectively (TRAP × 200) **Fig.5** Almost no osteoclast was found adding in 10<sup>-5</sup>mol/L simvastatin (TRAP × 200) **Fig.6** Formative absorption lacuna (blue site) in the bone slice, bone marrow was cultured 6 days under stimulation of PTHrP (Toluidine blue staining × 200) **Fig.7** Formative absorption lacuna in the bone slice, bone marrow was cultured 6 days under stimulation of PTHrP (stereoscan photograph × 100, 300μm) **Fig.8** The absorption lacuna obviously decreased adding in 10<sup>-7</sup>mol/L simvastatin (stereoscan photograph × 300, 100μm) **Fig.9** No absorption lacuna was found adding in 10<sup>-6</sup>mol/L simvastatin, (stereoscan photograph × 100)

的是 1α, 25-二羟维生素 D<sub>3</sub> 和地塞米松<sup>[4]</sup>, 但 1α, 25-二羟维生素 D<sub>3</sub> 不稳定, 见光易分解, 破骨细胞生成的结果也不稳定, 常常容易失败。PTHrP 刺激的破骨细胞形成比较稳定, 可以作为研究破骨细胞生理学的手段之一。另外, 在培养时, 比较关键的一步是在换液时, 不能换掉全部的液体: 首先在培养液中有许多自分泌或旁分泌的细胞因子, 刺激破骨细胞的生成; 其次, 破骨细胞的前体细胞在形成破骨细胞之前, 是悬浮不贴

壁的。交换所有培养液, 容易丢失破骨细胞前体细胞。一般文献报道是换 4/5 的液体, 但是由于培养液的蒸发, 往往交换 4/5 的培养液时已经相当于交换了全部培养液。本试验采用交换 1/2 的培养液较为合理。

他汀类药物抗骨质疏松症有很大的潜能, 是目前发现的一种能够既促进骨形成, 又抑制骨吸收的药物, 有学者报道<sup>[5,6]</sup> 辛伐他汀可降低外周血单核细胞 IL-6 的表达水平, 而

IL-6又是强有力的骨吸收因子。也有研究表明,各种调节骨代谢中骨吸收的激素和细胞因子均是通过针对 OPG (Osteoprotegerin)和 RANKL( receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B ligand)的影响来发挥作用的<sup>[7]</sup>。OPG 是通过和成骨细胞表面的 RANKL的结合竞争性地抑制 RANKL和 RANK的结合,从而抑制成骨细胞对破骨细胞分化和功能的激活,达到保护骨组织不被过度吸收的作用。余利鹏等<sup>[8]</sup>的实验证明,  $10^{-7}$  mol/L和  $10^{-6}$  mol/L的阿托伐他汀可以促进小鼠骨髓来源的成骨细胞 OPG mRNA水平的高表达,同时抑制成骨细胞内 RANKL mRNA水平,而在  $10^{-8}$  mol/L浓度的阿托伐他汀作用则不明显。

自 1999年 Mundy等<sup>[9]</sup>发现辛伐他汀的骨形成促进作用以来,大量的研究主要集中在对成骨细胞作用机制的研究,而辛伐他汀对破骨细胞的作用目前尚不清楚。有研究表明治疗骨质疏松的药物二磷酸盐,由于抑制甲羟戊酸代谢途径下游产物的生成,使 GTP(guanosine triphosphat)蛋白 ras, rho家族活化受阻而具有明显的抑制破骨细胞功能的作用<sup>[10]</sup>。在甲羟戊酸代谢途径中他汀类药物作为上游途径中 HMG-COA还原酶抑制剂,必将影响其下游产物的生成。因此他汀类药物在促进成骨细胞活性的同时,可能对破骨细胞也有抑制作用。Grasser等<sup>[11]</sup>研究表明洛伐他汀对体外培养新生大鼠破骨细胞的形成和分化有着明显的抑制作用,并提出洛伐他汀对破骨细胞的抑制作用是通过关键异戊烯化蛋白的二牛龙牛儿基丙酮完成的,并且他汀类药物的骨效应是影响局部破骨细胞的数量。von Knoch等<sup>[12]</sup>报道了大鼠口服  $120\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 洛伐他汀可以抑制超高分子量的聚乙烯颗粒诱导的大鼠颅骨的骨吸收,并使局部破骨细胞数目减少。本实验数据也验证了 Grasser和 von Knoch的试验结果。本研究通过建立 PIH $\mu$ P诱导的破骨细胞培养体系,用不同浓度的辛伐他汀干预,得出辛伐他汀不仅可以抑制破骨细胞的形成和功能,且其抑制作用呈剂量依赖。从而为他汀类药物治疗骨吸收性疾病提供了实验基础。

## 参考文献

- 1 Meier CR, Schlienger RG, Kraenzlin ME, et al HMG-COA reductase inhibitors and risk of fractures JAMA, 2000; 283: 3205-3210.
- 2 Wang PS, Andrade SE, Boles M, et al HMG-COA reductase inhibitors and risk of fractures in elderly patients JAMA, 2000; 283: 3211-3216.
- 3 陶惠人,王全平,李寰. 甲状旁腺素相关肽诱导骨髓细胞生成破骨细胞及对骨吸收的影响. 中国临床康复, 2004, 8(17): 3250-3251.
- 4 Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, et al Osteoclast like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures Endocrinol 1988, 122: 1373-1382.
- 5 Rezaie Majid A, Maca T, Bucek RA, et al Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin 6, interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein 1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients Arterioscl Thromb Vasc Biol 2002, 22: 1194-1199.
- 6 Scheidt Nave C, Bisner H, Leidelg-Bruckner G, et al Serum interleukin 6 is a major predictor of bone loss in women specific to the first decade post menopause. J Clin Endocrinol Metab 2001, 86: 2032-2042.
- 7 Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts Science 2000; 289: 1504-1508.
- 8 余利鹏,范卫民,张宁,等.阿托伐他汀对骨髓来源的成骨细胞中 OPG mRNA/RANKL mRNA水平的影响. 南京医科大学学报, 2005, 25(8): 544-546.
- 9 Mundy G, Garrett R, Harris S, et al Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins Science 1999, 286: 1946-1949.
- 10 Coxon FP, Helfrich MH, Van't HR, et al Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function and survival inhibition by bisphosphonates and GGTI-298 J Bone Miner Res 2000, 15: 1467-1476.
- 11 Grasser WA, Baumann AP, Petras SF, et al Regulation of osteoclast differentiation by statins JMNJ 2003; 3: 53-62.
- 12 von Knoch F, W edmeyer C, Heckelei A, et al A comparison of the antiresorptive effects of bisphosphonates and statins on polyethylene particle-induced osteolysis Biomed Tech (Berl), 2005; 50: 195-200.

(收稿日期: 2006-04-20 本文编辑: 王宏)

## 本刊关于一稿两投和一稿两用等现象的 处理声明

文稿的一稿两投、一稿两用、抄袭、假署名、弄虚作假等现象属于科技领域的不正之风,我刊历来对此加以谴责和制止。为防止类似现象的发生,我刊一直严把投稿时的审核关,要求每篇文章必须经作者单位主管学术的机构审核,附单位推荐信(并注明资料属实、无一稿两投等事项),希望引起广大作者的重视。为维护我刊的声誉和广大读者的利益,凡核实属于一稿两投和一稿两用等现象者,我刊将择期在杂志上提出批评,刊出其作者姓名和单位,并对该文的第一作者所撰写的一切文稿 2年内拒绝在本刊发表,同时通知相关杂志。欢迎广大读者监督。

《中国骨伤》杂志社