

辛伐他汀对体外培养鼠骨形成蛋白 BMP-2 基因的调控

芮丹云¹⁾, 唐丽媛¹⁾, 陈洁²⁾, 鲁宁³⁾

(1) 昆明学院医学院, 云南昆明 650214; 2) 云南省第一人民医院, 云南昆明 650032; 3) 昆明医科大学第二附属医院骨科, 云南昆明 650101)

[摘要] **目的** 研究辛伐他汀对鼠骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 及其 mRNA 表达的影响, 验证辛伐他汀是否能够促进鼠成骨细胞的骨形成. **方法** 将兔子分为假手术组, 模型组和辛伐他汀组 3 个小组, 每组 6 只. 在辛伐他汀组用药 1 月、2 月和 4 月时, 收集各组兔子的耳中央动脉血清, 将上述血清加入鼠 MC3T3-E1 细胞培养 4d 后提取总 RNA, 逆转录出骨形成蛋白 BMP-2 的 cDNA 后进行实时荧光定量 PCR, 对产物进行检测. **结果** 用药 1 个月, 辛伐他汀组 BMP-2 表达量较假手术组高 2.79 倍 ($P=0.0004$), 较模型组高 2.66 ($P=0.001$); 用药 2 个月, 辛伐他汀组 BMP-2 表达量较假手术组高 1.88 倍, 较模型组高 1.75 倍 ($P=0.001$); 用药 4 个月, 辛伐他汀组 BMP-2 表达量较假手术组高 0.86 倍 ($P=1.000$), 较模型组高 1.04 倍. **结论** 辛伐他汀对骨形成有正效应.

[关键词] 辛伐他汀; 骨形成蛋白-2; 荧光定量 PCR

[中图分类号] R523 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 04-0023-04

Regulation of Simvastatin on Bone Morphogenetic Protein-2 Gene of Rat in Vitro

RUI Dan-yun¹⁾, TANG Li-yuan¹⁾, CHEN Jie²⁾, LU Ning³⁾

(1) School of Medicine, Kunming University, Kunming Yunnan 650214; 2) First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650032; 3) The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of simvastatin on the expression of proteins and mRNA in bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) gene of rat osteoblasts, then confirm whether simvastatin can promote the bone formation in rats. **Methods** Rabbits were divided into three groups: sham-operated group, osteoporosis model group and simvastatin group, with six rabbits in each group. Rabbits ear arteries blood serums were collected respectively after drug intervention one, two and four months, which were used to culture MC3T3-E1 cell. Total RNA was extracted after four days of culture, then cDNA of BMP-2 was obtained using reverse transcription and all products were detected by real time quantitative PCR (RQ-PCR) technique. **Results** After one, two and four months, the BMP-2 expression quantity of simvastatin group was 2.79 ($P=0.004$), 1.88 ($P=0.005$) and 0.86 ($P=0.926$) times higher than that of sham-operated group, and 2.66, 1.75 ($P=0.009$) and 1.04 ($P=1.000$) times higher than that of osteoporosis model group, respectively. **Conclusion** Simvastatin has a positive effect on bone formation.

[Key words] Simvastatin; BMP-2; RQ-PCR

成骨细胞是体内唯一具有骨形成功能的细胞, 所有能导致成骨细胞数量减少、活性降低或降低成骨分化的因素都可能导致骨质疏松症的发生^[1].

骨髓间充质干细胞能够分化为肌细胞、软骨细胞、成骨细胞和脂肪细胞, 其分化过程受体内多种因子的调节. 在骨形成早期, BMP-2 不仅可使未分

[作者简介] 芮丹云 (1981~), 男, 云南昆明市人, 在读硕士研究生, 讲师, 主要从事分子医学研究工作.

[通讯作者] 鲁宁. E-mail: Luningwei2@163.com

化间质细胞向骨形成中心募集,并分化为骨系细胞,而且可使成纤维细胞、成肌细胞及骨髓的基细胞逆转化为骨系细胞^[2-5]。BMP-2 还可使成骨细胞维持其特有细胞表型,并诱导成骨细胞标志物的增高,促进细胞外基质钙化。在骨形成后期,BMP-2 又作为一种破骨细胞分化因子与其它支持破骨细胞分化因子直接或间接刺激破骨细胞分化,参与骨的重建^[6-11]。

1 资料与方法

1.1 一般资料

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是以骨量减少、骨组织显微结构破坏导致骨脆性和骨折危险性增加为特征的一种系统性、全身性骨骼疾病,常见于绝经后妇女和老年人。目前全球 OP 患者已经超过 2 亿人,且随着人口向老龄化发展,OP 发病率持续上升。有 40% OP 患者将会经历骨折,仅髌部骨折就使同龄妇女死亡率上升 10%~20%。成功建立骨质疏松模型性骨折动物模型是深入进行 OP 愈合研究的基础。

1.2 实验动物

60 只 6 月龄新西兰系纯种雌性大白兔,体重 2.5~3.0 kg,由昆明医科大学实验动物中心提供(实验动物生产许可证号:SCXK(滇)2005-0008,实验动物使用许可证号:SYXK(滇)2005-0004。实验前置动物于室内适应环境 2 周,单笼喂养,自由饮水,饲养温度 20℃~25℃。

1.3 药物及试剂

1.3.1 药物 辛伐他汀片(40 mg/片,Merck Sharp & Dohme Limited U.K.生产,生产批号:110156) I 型胶原 N 末端肽 (NTX) 酶联免疫分析试剂盒(武汉华美生物工程有限公司)。

1.3.2 主要实验设备 实时荧光定量 PCR 仪 TP800,宝生物工程(大连)有限公司,PCR 仪 PRISM 7300 Real-Time PCR System,美国 ABI 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 造模与分组 60 只 6 月龄新西兰系纯种雌性兔随机分为模型组 20 只、辛伐他汀组 20 只和假手术组 (Sham 组) 20 只。适应性喂养 2 周后,戊巴比妥钠溶液按 30 mg/kg 耳缘静脉注射麻醉,无菌条件下取下腹部正中切口,打开腹腔,模型组以及辛伐他汀组去除双侧卵巢,结扎输卵管,缝合腹壁各层;Sham 组只打开腹腔,找到卵巢外置 1 min 后放回原位,切除腹腔内 2 块与卵巢大小相当的脂肪块后关闭腹腔。术后安置在饲养温度 20℃~25

℃,相对湿度 40%~70%环境中。术后 5 d 内肌注青霉素 30 万 U/kg,每天 1 次。术后定量喂食 (50 g/d),自由饮水。术后 150 d 内实验动物死亡 3 只(每组各 1 只)。术后 150 d 时,3 个实验组随机抽取动物进行模型验证,证明模型组以及辛伐他汀组骨质疏松模型复制成功后,3 组动物随机抽取 18 只兔继续实验。各组再分成用药 30 d、60 d、120 d 3 个时相组,6 只/组。于药物干预 30 d、60 d、120 d 时从各组 6 只动物的耳中央动脉采血并分离含药血清。(由于兔子死亡以及考虑储备实验动物,故最终分组兔子为 6 只,但满足统计学要求)。

1.4.2 给药 分组后辛伐他汀组即开始用药,用药方式为:将已研磨成粉末状的辛伐他汀片拌于 10 g 饲料中,喷洒少量纯水后充分混匀,按 5 mg/(kg·d)辛伐他汀的剂量于每日 20 点给药(只投放拌有药物的饲料),待实验动物食尽含药饲料后,再于 22 点补充饲料 40 g,每天给药 1 次。Sham 组和模型组只于饲料上喷洒等量纯水。

1.4.3 含药血清的制备 于药物干预 30 d、60 d、120 d 时从各组中随机抽取 6 只耳中央动脉采血并分离含药血清。上述各组动物在各时相点末次给药后 1 h,无菌操作下自耳中央动脉取血,静置 2 h 后 3 000 r/min 离心 25 min,每组血清混匀(有溶血的剔除),56℃水浴 30 min 灭活补体,经 0.22 μm 滤膜抽滤除菌,分装后液氮罐保存备用。

1.4.4 细胞实验 MC3T3-E1 细胞按 8×10^4 孔铺于 6 孔板中,每孔体积 1.8 mL,12 h 后加入 200 μL 不同月份不同组别含药血清,隔天换液 1 次,4 d 后按 TaKaRa 的 RNAiso Plus 操作步骤提取细胞总 RNA,取 750 ng RNA 按 TaKaRa 的 PrimeScript RT reagent Kit with cDNA Eraser (Perfect Real Time) 操作步骤逆转录之后 10 倍稀释,之后进行实时荧光定量 PCR (SYBR 法),每个样品做 3 个重复,同时以 RNase Free dH₂O 做阴性对照。

1.4.5 Real Time PCR 所用引物及反应体系 β-actin-F: 5'-CATCACTATTGGCAACGAGCGGT-TC-3' β-actin-R: 5'-GGTCTTTACGGATGTCAACG-TCACAC-3'产物 137 bp BMP-2-F: 5'-GGAAAAGGA-CATCCGCTCCACAAACGA-3' BMP-2-R: 5'-TTCCA-CCCCACATCACTGAAGTCCAC-3'产物 122 bp. Real time PCR 反应程序见图 1. Real time PCR 最佳反应组分见表 1。

1.5 统计学处理

数据用 SPSS 统计软件进行统计学处理,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

通过电泳测试, 电泳条带清晰, 见图 2. 溶解曲线出现单一峰值, 说明引物特异性好, 见图 3、图 4. 目标基因和参照基因扩增效率都接近 100% 且效率偏差在 5% 以内, 故采用 2⁻ (Livak) 法对数据进行处理.

用药 1 个月, 辛伐他汀组 BMP-2 表达量较假手术组高 2.79 ($P=0.004$) 倍, 较模型组高 2.66 ($P=0.001$); 用药 2 个月, 辛伐他汀组 BMP-2 表达量较假手术组高 1.88 ($P=0.009$) 倍, 较模型组高 1.75 ($P=0.009$) 倍; 用药 4 个月, 辛伐他汀组 BMP-2 表达量较假手术组高 0.86 ($P=0.926$) 倍, 较模型组高 1.04 倍 ($P=1.000$).

说明辛伐他汀药物组的家兔血清的确有提高小鼠颅骨 MC3T3-E1 细胞 BMP-2 的作用, 提示辛伐他汀可能在骨质疏松性骨折愈合方面有临床运用价值.

表 1 Real Time PCR 最佳反应组分
Tab. 1 The procedure of real time PCR

试剂	使用量 (μL)
SYBR Premix Ex Taq™ II (2 \times)	12.5
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5
cDNA	2
RNase Free dH2O	9.5
Total	25

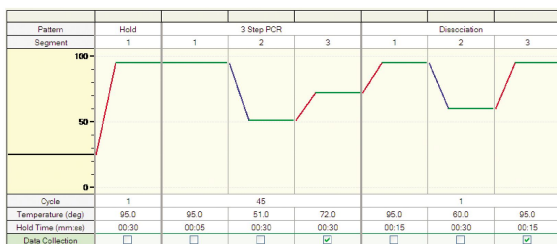


图 1 Real Time PCR 反应程序
Fig. 1 The procedure of real time PCR

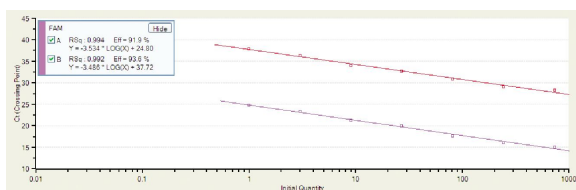


图 2 2%琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 2 The electrophoretogram
A: β -actin; B: BMP-2; M: DL500.

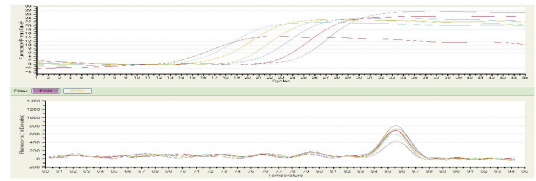


图 3 β -actin 扩增曲线和融解曲线
Fig. 3 The amplification and dissociation curves of β -actin



图 4 BMP-2 扩增曲线和融解曲线
Fig. 4 The amplification and dissociation curves of BMP-2

3 讨论

骨形成蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 是转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) 超家族成员, 是一种很重要的能刺激骨髓间充质干细胞成骨分化的调节因子. BMP-2 是影响成人骨骼的 BMPs 中最重要的一员, BMP-2 能促进成骨前体细胞的分化并抑制脂肪前体细胞的分化, 外源性植入 BMP-2 能促进体内骨形成^[12-15]. 研究发现, BMPs 主要通过和细胞表面 I 型和 II 型 BMP 受体结合而引发 BMP 信号转导通路, 其信号转导通路主要包括 2 条: (1) 通过激活 Smad1、5、8 而引起的经典的 Smad 通路, 其中 RUNX2 (runt-related transcription factor 2, 又名 core binding factor alpha 1, Cbf α 1) 是此通路中主要的成骨转录因子; (2) 包含有 p38、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 和细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 在内的分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路^[16]. 因此 BMP-2 表达水平的提高有助于刺激骨髓间充质干细胞向成骨分化.

在本研究中, 3 个时段的检测结果都显示辛伐他汀组细胞表达 BMP-2 水平高于假手术组和模型组, 但是随着时间推移, 药物对表达量的影响有递减的趋势. 由此可以证明含辛伐他汀药物的家兔血清对于小鼠骨髓间充质细胞向成骨细胞转化有正效应, 推测辛伐他汀对骨质疏松性骨折的愈合具有一定疗效. 但同时, 本研究还观察到长期用药的家兔血清对于小鼠 MC3T3-E1 细胞

BMP-2 产量的影响要小于短期用药的家兔血清,因此推测长期使用辛伐他汀,机体会产生抗药性导致药物治疗骨质疏松性骨折疗效会降低,应该结合其他方法予以结合治疗。

[参考文献]

- [1] BLIUC D, NGUYEN N D, MILCH V E, et al. Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women[J]. JAMA, 2009, 301(5):513 - 521.
- [2] 罗林枝, 徐苓. 骨质疏松性髓部骨折的直接经济负担及其影响因素分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(9):669 - 672.
- [3] MACLEAN C, NEWBERRY S, MAGLIONE M, et al. Systematic review: comparative effectiveness of treatments to prevent Fractures in men and women with Low bone density or osteoporosis[J]. Ann Intern Med, 2008, 148(3):197 - 213.
- [4] 简小冲, 陈江, 黄文秀, 等. 伐他汀对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织BMP-2及信号转导蛋白Smad1/5表达的影响 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2007, 2(11):1 217 - 1 220.
- [5] 刘文佳, 王晓庚, 周洪, 等. 体外大鼠成骨细胞对破骨细胞形成的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2008, 29(3):281 - 284.
- [6] SIMON L S. Osteoporosis. Rheum Dis Clin North Am, 2007, 33(1):149-176.
- [7] 吴小涛, 王海军, 宋萍. 1, 25 (OH) 2 D3对体外培养大鼠成骨细胞RANKL /OPG mRNA表达的影响[J]. 东南大学学报(医学版), 2007, 26(1):32 - 35.
- [8] CHITRE M, SHECHTER D, GRAUER A. Denosumab for treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. Am J Health Syst Pharm, 2011, 68(15):1 409 - 1 418.
- [9] SALARI SHARIF P, ABDOLLAHI M, LARIJANI B. Current, new and future treatments of osteoporosis [J]. Rheumatol Int, 2011, 31(3):289 - 300.
- [10] DOMINGUEZ L J, SCALISI R, BARBAGALLO M. Therapeutic options in osteoporosis [J]. Acta Biomed, 2010, 81(4): 55 - 65.
- [11] CHEN P Y, SUN J S, TSUANG Y H, et al. Simvastatin promotes osteoblast viability and differentiation via Ras/Smad/Erk/BMP-2 signaling pathway [J]. Nutr Res, 2010, 30(3):191 - 199.
- [12] 朱太咏, 石印玉, 张戈, 等. 仙灵骨葆改善去卵巢骨质疏松模型大鼠松质骨骨质量的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2006, 1(3):138 - 141.
- [13] 林伯庚, 王叶, 邓满香. 辛伐他汀对老年骨质疏松患者骨密度的影响[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(22): 2 948 - 2 949.
- [14] MITTRA E, RUBIN C, GRUBER B, et al. Evaluation of trabecular mechanical and microstructural properties in human calcaneal bone of advanced age using mechanical testing, microCT, and DXA[J]. J Biomech, 2008, 41(2): 368 - 375.
- [15] BRANDI M L. Microarchitecture, the key to bone quality [J]. Rheumatology(Oxford), 2009, 48: 3 - 8.
- [16] 周磊, 周东风, 谭耀文. 辛伐他汀对去势大鼠骨生长代谢的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2006, 22(6): 746 - 750.

(2015 - 02 - 07 收稿)