

· 药物研究 ·

# 辛伐他汀在模拟微重力环境对成骨细胞增殖和凋亡的影响

宋淑军<sup>1</sup> 司少艳<sup>1</sup> 刘俊丽<sup>1</sup> 周金莲<sup>1</sup> 史亮<sup>2</sup> 贾桂玥<sup>3\*</sup> 谭小清<sup>1</sup> 张建中<sup>1\*</sup>

中图分类号: R 852.22 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)11-0993-04

**摘要:** 目的 观察辛伐他汀在模拟微重力环境下对成骨细胞增殖和凋亡的影响。方法 利用沿水平轴连续回转(30 r/min)细胞培养系统模拟微重力环境,使用 MTT 比色法观察小鼠成骨样细胞 MC3T3-E1 的增殖情况;细胞凋亡是根据 4,6-二氨基-2-苯基吲哚所染细胞核形态的改变来辨认。结果 模拟微重力环境可以降低 MC3T3-E1 增殖功能,辛伐他汀在模拟微重力环境可以增强 MC3T3-E1 增殖功能,但对细胞的凋亡并无显著影响。结论 在模拟微重力环境下辛伐他汀对成骨细胞增殖功能具有保护作用,为辛伐他汀治疗微重力环境骨丢失提供了理论和实验证据。

**关键词:** 微重力; 辛伐他汀; 成骨细胞; 增殖; 凋亡

**The effect of simvastatin on proliferation and apoptosis of the osteoblast in simulated microgravity environment** SONG Shujun, SI Shaoyan, LIU Junli, et al. Department of Pathology and Laboratory, PLA 306 Hospital, Beijing 100101, China

Corresponding author: ZHANG Jianzhong, Email: zhangjz55@sina.com; JIA Guiye, Email: jiaguiyue@126.com

**Abstract:** **Objective** To observe the effect of simvastatin on proliferation and apoptosis of the osteoblast in simulated microgravity environment. **Methods** The microgravity environment was simulated using a horizontally rotated (30 r/min) cell culture system. The proliferation of mouse MC3T3-E1 osteoblast-like cells was observed using MTT assay. Cell apoptosis was identified according to the variation of nuclear morphology using 4, 6-diamidino-2 phenylindole (DAPI) staining. **Results** Simulated microgravity environment could decrease the proliferation of MC3T3-E1 cells. Simvastatin could increase the proliferation of MC3T3-E1 in simulated microgravity environment. However, simvastatin had no effect on apoptosis of the osteoblast. **Conclusion** Simvastatin plays a protective role for osteoblast proliferation in simulated microgravity environment. This provides theoretical and experimental evidences of simvastatin for the treatment of microgravity-induced bone loss.

**Key words:** Microgravity; Simvastatin; Osteoblasts; Proliferation; Apoptosis

随着载人航天事业的发展,航天医学的研究变得越来越重要。航天飞行过程中微重力环境使人体多个器官和组织发生显著而持续的生理或病理变化,其中骨丢失是目前航天事业面临最严重的问题,也是长期太空飞行最大的障碍<sup>[1]</sup>,到目前为止,太空微重力环境所导致的快速骨丢失尚无有效的防治

措施,因此其防治的探讨将对航天事业的发展具有重要意义。太空微重力环境骨代谢平衡紊乱是导致骨快速丢失的重要原因,骨形成功能降低,骨吸收功能增强,从而导致骨代谢的不平衡<sup>[2,3]</sup>。在骨代谢的两种主要细胞成分-成骨细胞和破骨细胞中,成骨细胞在骨代谢过程中起着非常重要的作用,成骨细胞不仅负责骨的形成,而且负责调节破骨细胞的生成和活性,成骨细胞功能的正常是维持骨代谢正常的必要保障。因此微重力环境中成骨细胞功能的研究对了解微重力所致骨代谢不平衡具有重要意义。重力或机械刺激对成骨细胞的功能有显著影响,在微

基金项目: 本课题受国家教育部留学回国人员启动资金资助。

作者单位: 100101 北京,1. 解放军第 306 医院实验科; 2. 解放军黄寺美容外科医院妇产科

\* 通讯作者: 张建中, Email: zhang255@sina.com; 贾桂玥, Email: jiaguiyue@126.com

重力情况下培养的成骨细胞,细胞呈收缩状态,细胞的数量减少<sup>[4]</sup>,太空微重力环境明显抑制成骨细胞的增殖<sup>[5]</sup>,这些均表明微重力环境中的成骨细胞的增殖功能受到了明显的影响。维持正常的细胞增殖和凋亡是在细胞新陈代谢过程中保证细胞数量的必备条件。因此纠正微重力对成骨细胞增殖或凋亡的影响可能是治疗微重力环境骨丢失的一种重要手段。

辛伐他汀是在八十年代后期上市的一种他汀类(statin)降血脂药物,他汀类药物特异性的抑制 3-羟基-3-甲基-辅酶 A 还原酶,从而抑制胆固醇生物合成,临床用于治疗高胆固醇血症,冠心病等。近年来发现以辛伐他汀为主的他汀类药物可以影响骨代谢,促进骨形成、减少骨折发生率、恢复骨骼微结构、增加骨骼强度,从而用于骨质疏松的治疗<sup>[6]</sup>。辛伐他汀在治疗骨质疏松的过程中,可以影响成骨细胞的增殖和凋亡,促进骨形成。细胞增殖和凋亡是维持组织正常细胞数量最重要的两个环节,成骨细胞增殖和凋亡功能的正常对保持骨组织结构和功能完整以及组织损伤的修复具有非常重要的作用,充足的细胞数量是必要的保障。有研究表明,在正常培养情况下辛伐他汀可以减轻肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )诱导的成骨细胞生长抑制和凋亡<sup>[7]</sup>,因此,辛伐他汀有可能对微重力环境下成骨细胞生长或凋亡有相似的作用,但目前辛伐他汀在模拟微重力情况下对骨代谢或成骨细胞功能的影响尚无研究报道。本研究目的是利用地面上模拟微重力实验技术,探讨辛伐他汀在模拟微重力环境对成骨细胞增殖功能以及凋亡的影响,为微重力环境骨丢失的防治提供实验和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

细胞培养液 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)及新生牛血清均为 Gibco 产品。小鼠成骨样细胞系 MC3T3-E1 为本室保存。MTT 检测试剂以及辛伐他汀购自 Sigma。

### 1.2 MC3T3-E1 细胞传代培养

小鼠成骨样细胞株 MC3T3-E1 为本室保存,细胞培养液使用 DMEM,含有 10% 新生牛血清,青霉素(100IU/ml),链霉素(100 IU/ml),细胞培养在 37°C、含 5% 的二氧化碳培养箱中,生长至 80% 融合时进行传代。

### 1.3 细胞增殖功能的检测

使用 MTT 比色法,活的细胞可以通过其线粒体中的还原酶把黄色的四甲基偶氮唑盐(MTT)还

原为不溶于水的蓝紫色甲臞结晶,通过紫色甲臞结晶产生的量反应活细胞数量,从而间接检测细胞增殖情况。正常培养的 MC3T3-E1 细胞被种植在 96 孔板( $10^4/\text{CM}^2$ )中,在 37°C、含 5% 的二氧化碳的空气中培养 3d,随后无血清培养 16h,分别用不同剂量的辛伐他汀在无血清细胞培养液中处理细胞 1d,加入 10% MTT 溶液(5mg/ml)继续培养细胞 2h,弃去细胞培养液,并加入 DMSO(100 $\mu\text{l}$ /孔)轻微震荡,采用比色法通过酶联免疫仪检测  $A_{490}$  值。

### 1.4 细胞凋亡的检测

利用我们曾使用的细胞形态学方法<sup>[8]</sup>。简述如下,把培养有细胞的玻片经 PBS 冲洗后,用 4% 多聚甲醛固定细胞 10min 并用 0.5% Triton X-100 处理细胞 10min,使细胞膜具有渗透性,用含有 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 4,6-二氨基-2-苯基吲哚封片胶(25% 聚乙烯醇,30% 甘油和 0.1% 叠氮化钠)封片,使用连接于 Olympus 荧光显微镜上的数码相机拍照,全部的细胞核及凋亡的细胞核采用人工计数(依据凋亡细胞核具有明显的核浓缩和片段化的形态学判断),并以凋亡的细胞占全部细胞的比率来表示。

### 1.5 模拟微重力环境的细胞培养

体外模拟微重力细胞培养采用充满液体的圆柱形培养容器沿水平轴旋转。小鼠成骨样细胞 MC3T3-E1( $3 \times 10^4$ )被种植在置于 6 孔板中的玻片(2.2cm $\times$ 2.6cm)上,在含 10% 新生牛血清的培养基中,37°C、含 5% 的二氧化碳中进行培养 3d,随后在相同条件下无血清培养 16h,然后把玻片转移至盛满无血清培养液(含或不含  $10^{-6}$  Mol/L 辛伐他汀)的回转器专用培养容器中,沿水平轴连续回转(30r/min,37°C)1d,并设对照组(在相同的培养容器中)静止培养 1d 做细胞增殖实验,把玻片转移至含 10% MTT 的无血清培养液的 6 孔板中继续培养 2h,弃去细胞培养液,并加入 DMSO(700 $\mu\text{l}$ /孔)轻微震荡混匀,每孔各取 100 $\mu\text{l}$  至 96 孔板用酶联免疫仪检测  $A_{490}$  值,检测细胞增殖功能;细胞回转或静止培养 2d 做细胞凋亡实验,见材料与方法 1.4。

### 1.6 统计学方法

采用双尾非成对 Student's *t*-检验法比较处理组和对照组间测定值, $P < 0.05$  被判定为统计学有显著差异。

## 2 结果

### 2.1 辛伐他汀对成骨细胞增殖的影响

辛伐他汀对成骨细胞增殖的影响是通过 MTT

比色法进行检测,结果显示辛伐他汀呈剂量依赖性的促进小鼠成骨样细胞株 MC3T3-E1 的增殖(图 1),辛伐他汀的浓度在  $10^{-8}$  Mol/L 时即可显著增加 MC3T3-E1 的增殖( $P < 0.05$ ),在  $10^{-8} \sim 10^{-6}$  Mol/L 浓度范围内,辛伐他汀可以使  $A_{490}$  值增加,说明在一般细胞培养环境中,此浓度范围内辛伐他汀可促进成骨细胞增殖。但辛伐他汀在  $10^{-5}$  Mol/L 其所得  $A_{490}$  值与对照组间比较,统计学上无显著的差异。在以后模拟微重力回转培养实验中使用辛伐他汀的浓度为  $10^{-6}$  Mol/L。

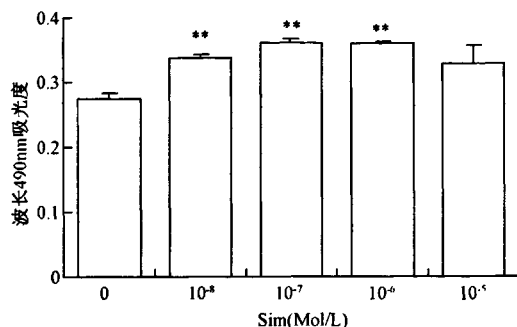


图1 辛伐他汀对 MC3T3-E1 细胞增殖功能的影响

注:与对照组比较 (\*\* $P < 0.001$ )

Sim: simvastatin, 辛伐他汀。

## 2.2 辛伐他汀在模拟微重力环境对成骨细胞增殖的影响

为了探讨在模拟微重力环境辛伐他汀对成骨细胞增殖的作用,本实验利用 MTT 比色法和多样本回转器,发现旋转培养的 MC3T3-E1 所得  $A_{490}$  值较未旋转组明显缩小( $P < 0.05$ ),预示细胞增殖功能在模拟微重力环境明显减弱(图 2)。而当细胞培养液中加入  $10^{-6}$  Mol/L 的辛伐他汀时,旋转培养的细胞所得  $A_{490}$  值则较无辛伐他汀旋转组  $A_{490}$  值明显提高( $P < 0.05$ ),其  $A_{490}$  值和无旋转组的  $A_{490}$  接近(图 2),说明辛伐他汀具有保护 MC3T3-E1 细胞在模拟微重力环境下的增殖功能。

## 2.3 辛伐他汀对成骨细胞凋亡的影响

成骨细胞 MC3T3 无论静止或回转培养,结果显示辛伐他汀处理组和对照组细胞凋亡比率无显著差异。

## 3 讨论

本实验使用辛伐他汀处理成骨细胞,剂量为  $10^{-8} \sim 10^{-5}$  Mol/L,结果显示辛伐他汀呈剂量依赖性增强小鼠成骨样细胞 MC3T3-E1 的增殖功能,这进一步证实了他汀类药物对成骨细胞增殖功能的刺激

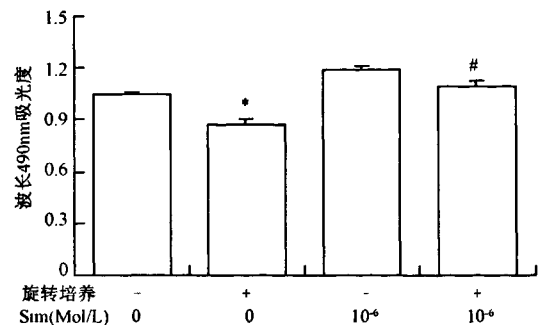


图2 在模拟微重力环境辛伐他汀对 MC3T3-E1 细胞增殖功能的影响,与未旋转培养对照组比

\*  $P < 0.05$ ; 与旋转培养无辛伐他汀组比#  $P < 0.05$ 。

Sim: 辛伐他汀。

作用。前期有实验显示他汀类的药物在体外或体内均可以促进成骨细胞或前成骨细胞的增殖。有学者使用红酵母(其生物活性成分为洛伐他汀)处理成骨细胞,其可以促进细胞的增殖和分化<sup>[9]</sup>。另一研究表明在大鼠颅骨损伤模型中,使用辛伐他汀可以促进成骨前身细胞的增殖和迁移,促进新骨的生成<sup>[10]</sup>。这些研究结果表明辛伐他汀促新骨形成至少部分是由于其促成骨细胞或前成骨细胞增殖功能所致。

细胞增殖功能的正常对保持组织结构和功能完整以及组织损伤的修复具有非常重要的作用,无论是正常组织代谢还是组织修复,充足的细胞数量是必要的保障。太空微重力环境,成骨细胞增殖的抑制状态是导致太空骨丢失的愿因之一,辛伐他汀在治疗骨质疏松的过程中,刺激成骨细胞的增殖,促进骨形成是其治疗机制之一。这种功能在模拟微重力环境是否有同样的效果,目前尚无报道。

本实验结果显示模拟微重力环境使成骨样细胞数量减少,即模拟微重力抑制细胞的增殖功能,这和以前报道是一致的,而辛伐他汀在模拟微重力环境中可以防治细胞数量的减少,保护成骨样细胞的增殖功能,而免受模拟微重力环境对成骨细胞增殖的抑制作用。本实验表明辛伐他汀可以纠正由于微重力环境所致成骨细胞增殖功能的下降。太空微重力环境骨代谢平衡紊乱是导致骨快速丢失的重要原因,骨形成功能降低,骨吸收功能增强,从而导致骨代谢的不平衡<sup>[2-3]</sup>。太空微重力环境成骨细胞的增殖处于一种受抑制状态,辛伐他汀改善这种成骨细胞增殖的抑制状态,保证有足够的成骨细胞数量和骨的形成,这可能从细胞水平为使用辛伐他汀治疗太空微重力环境的骨丢失提供了依据。

近年来为了深入了解微重力环境骨丢失的机理,人们在细胞水平做了大量研究。重力或机械刺激对成骨细胞的形成和功能起着非常重要的作用,在模拟微重力情况下培养的成骨细胞,表现为受抑制状态。小鼠成骨样细胞 MC3T3-E1 在太空中培养 9d,明显抑制细胞的早期生长基因/生长因子环氧化酶-2、c-myc、细胞增殖核抗原、成纤维细胞生长因子等的基因表达<sup>[11]</sup>。体内实验也证实失负荷可抑制小梁骨和骨膜的前成骨细胞的增殖功能<sup>[12]</sup>。这些结果均说明微重力环境对成骨细胞的负面影响,这可能是导致微重力环境快速失骨的重要原因之一。本实验显示辛伐他汀可以纠正由于微重力环境所致成骨细胞增殖功能的下降,也即辛伐他汀在微重力环境对成骨细胞的增殖功能具有保护作用。这可能为辛伐他汀从细胞水平治疗太空微重力环境骨丢失提供了理论证据。

凋亡是影响细胞数量的另一因素,有研究显示他汀类药物可以导致某些细胞的凋亡增加,如甲状腺癌细胞<sup>[13]</sup>,人气道平滑肌和人类气道成纤维细胞<sup>[14]</sup>以及人的肝癌细胞等<sup>[15]</sup>。但有研究显示他汀药物可以抑制肿瘤坏死因子诱导的成骨细胞的凋亡<sup>[7]</sup>。但在模拟微重力培养情况下,我们未发现辛伐他汀对小鼠成骨细胞凋亡的影响。这可能与细胞的不同生长条件有关,但其机理尚需进一步的研究。

结论:体外实验结果显示模拟微重力环境可以降低成骨细胞的增殖功能,而辛伐他汀在模拟微重力环境对成骨细胞的增殖功能具有保护作用,但对细胞的凋亡无显著影响。

#### 【参 考 文 献】

- [1] Fong K. The next small step. *BMJ*, 2004, 329 (7480): 1441-1444.
- [2] Makihira S, Kawahara Y, Yuge L, et al. Impact of the microgravity environment in a 3-dimensional clinostat on osteoblast-and osteoclast-like cells. *Cell Biol Int*, 2008, 32 (9):1176-1181.
- [3] Tamma R, Colaianni G, Camerino C, et al. Microgravity during spaceflight directly affects *in vitro* osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J*, 2009, 23(8):2549-54.
- [4] Hughes-Fulford M. Physiological effects of microgravity on osteoblast morphology and cell biology. *Adv Space Biol Med*, 2002, 8:129-157.
- [5] Hughes-Fulford M. Changes in gene expression and signal transduction in microgravity. *J Gravit Physiol*, 2001, 8:1-4.
- [6] Jadhav SB, Jain GK. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. *J Pharm Pharmacol*, 2006, 58(1):3-18.
- [7] Yang YM, Huang WD, Xie QM, et al. Simvastatin attenuates TNF-alpha-induced growth inhibition and apoptosis in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Inflamm Res*, 2010, 59(2): 151-157.
- [8] Song, SJ, Page1 CN, Campbell TM, P et al. The role of protease-activated receptor-1 in bone healing. *Am J Path*, 2005, 37: 206-213.
- [9] Cho YE, Alcantara E, Kumaran S, et al. Red yeast rice stimulates osteoblast proliferation and increases alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 cells. *Nutr Res*, 2010, 30 (7):501-510.
- [10] Nyan M, Miyahara T, Noritake K, et al. Molecular and tissue responses in the healing of rat calvarial defects after local application of simvastatin combined with alpha tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2010, 93 (1):65-73.
- [11] Chattopadhyay N, Quinn SJ, Kifor O, et al. The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. *Biochem Pharmacol*, 2007, 74(3): 438-447.
- [12] Barbara A, Delannoy P, Denis BC, et al. Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells. *Metabolism*, 2004, 53(4):532-537.
- [13] Zeybek ND, Gulcelik NE, Kaymaz FF, et al. Rosuvastatin induces apoptosis in cultured human papillary thyroid cancer cells. *J Endocrinol*, 2011 Apr 8. [Epub ahead of print]
- [14] Ghavami S, Mutawe MM, Sharma P, et al. Mevalonate cascade regulation of airway mesenchymal cell autophagy and apoptosis: a dual role for p53. *PLoS One*, 2011, 6(1):e16523.
- [15] Zhang W, Wu J, Zhou L, et al. Fluvastatin, a lipophilic statin, induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells through mitochondria-operated pathway. *Indian J Exp Biol*, 2010, 48(12):1167-1174.

(收稿日期: 2011-05-27)

# 辛伐他汀在模拟微重力环境对成骨细胞增殖和凋亡的影响

作者: [宋淑军](#), [司少艳](#), [刘俊丽](#), [周金莲](#), [史亮](#), [贾桂玥](#), [谭小清](#), [张建中](#)  
作者单位: [宋淑军, 司少艳, 刘俊丽, 周金莲, 贾桂玥, 谭小清, 张建中\(解放军第306医院实验科, 北京, 100101\)](#), [史亮\(解放军黄寺美容外科医院妇产科, 北京, 100101\)](#)  
刊名: [中国骨质疏松杂志](#)   
英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)  
年, 卷(期): 2011, 17(11)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zggzsszz201111014.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201111014.aspx)