

# 辛伐他汀对大鼠骨髓基质干细胞Wnt信号通路相关因子表达的影响\*

郑 桓<sup>1</sup>, 张 柳<sup>1,2</sup>, 田发明<sup>2</sup>, 张 辉<sup>2</sup>, 穆树林<sup>2</sup>

## Simvastatin effects on correlation factor expression of Wnt signaling pathway in rat bone marrow stromal stem cells

Zheng Huan<sup>1</sup>, Zhang Liu<sup>1,2</sup>, Tian Fa-ming<sup>2</sup>, Zhang Hui<sup>2</sup>, Mu Shu-lin<sup>2</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** As a lipid-lowering drug, simvastatin is getting more and more attention for its potential effects on bone formation in research of bone metabolism, but contradiction still exists when it is used for *in vivo* study.

**OBJECTIVE:** To investigate the effects of simvastatin on bone mass, proliferation and differentiation of the cultured bone marrow stromal cells (BMSCs) in rats, as well as mRNA expression levels of some related factors of Wnt signaling pathway.

**METHODS:** A total of 36 6-week-old female Sprague-Dawley rats were randomized into two groups. In the control group, the rats were treated with distilled water daily by gavage. In the experimental group, the rats were administrated 20 mg/kg simvastatin per day. Six rats from either group were sacrificed after the final administration at 3, 6, 9 weeks separately. The left femora were removed for the measurement of bone mineral density (BMD). BMSCs derived from the right femora and tibiae were cultured in osteoblastic differentiation-induced medium. Alkaline phosphatase (ALP) activity measurement and ALP staining were performed on day 16. Real-time PCR was used to evaluate the mRNA expression levels of LRP-5, Axin2 and  $\beta$ -catenin on day 21 following total RNA was extracted.

**RESULTS AND CONCLUSION:** After being administrated with simvastatin for 3, 6 and 9 weeks, BMD of rats had no significant change. There were no significant differences in gene mRNA levels and osteogenic differentiation potential in BMSCs cultured *in vitro* compared with the control group. Administrated with simvastatin for either 3, 6 or 9 weeks had no significant effect on BMD and the differentiation of BMSCs in rats, and on the expression levels of LRP-5, Axin2 and  $\beta$ -catenin mRNA.

Zheng H, Zhang L, Tian FM, Zhang H, Mu SL. Simvastatin effects on correlation factor expression of Wnt signaling pathway in rat bone marrow stromal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(23): 4191-4194. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 辛伐他汀作为降脂类药物,具有一定的潜在促骨形成作用,并因此成为骨代谢领域的研究热点,但在体内试验中对其促进成骨的作用尚存争议。

**目的:** 观察辛伐他汀体内给药对大鼠骨量和骨髓基质干细胞增殖、分化的影响,及其在此过程中 Wnt 信号通路相关因子 mRNA 表达水平的变化。

**方法:** 6 周龄雌性 SD 大鼠 36 只随机分成 2 组:对照组每天蒸馏水灌胃;实验组辛伐他汀灌胃 20 mg/(kg·d)。分别于给药后 3, 6, 9 周处死两组大鼠各 6 只,取左侧股骨行骨密度测定;取右侧股骨和胫骨骨髓细胞向成骨方向诱导培养,于细胞培养第 16 天检测碱性磷酸酶比活性、碱性磷酸酶染色;细胞培养第 21 天提取总 RNA,采用 Real-time RT-PCR 检测 LRP-5、Axin2、 $\beta$ -catenin 的 mRNA 的表达。

**结果与结论:** 辛伐他汀体内给药干扰 3, 6, 9 周后大鼠骨密度均无显著变化,体外培养骨髓基质干细胞所有检测基因 mRNA 水平、成骨分化能力与对照组相比差异均无显著性意义。辛伐他汀体内给药 3, 6, 9 周对大鼠骨量及骨髓基质干细胞的分化及 LRP-5、Axin2、 $\beta$ -catenin mRNA 表达无显著作用。

**关键词:** 辛伐他汀; 骨密度; 骨髓基质干细胞; Real-time PCR; Wnt/ $\beta$ -catenin

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.23.003

郑桓, 张柳, 田发明, 张辉, 穆树林. 辛伐他汀对大鼠骨髓基质干细胞 Wnt 信号通路相关因子表达的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(23):4191-4194. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

自 1999 年 Mundy 等<sup>[1]</sup>首次发现他汀类药物具有促进骨形成的作用潜能以来,众多学者对此进行了深入研究。随后,大多数体外实验都证实了辛伐他汀的潜在促进骨形成的作用<sup>[2-10]</sup>,但体内试验中对其成骨潜能尚存争议<sup>[11-12]</sup>,部分研究表明辛伐他汀可增加去卵巢大鼠的骨量<sup>[13]</sup>,在促进骨形成增加密质骨骨密度的同

时,也抑制松质骨骨量的丢失<sup>[14]</sup>。但 Maritz 等<sup>[15]</sup>的实验却发现他汀类药物可降低正常大鼠的骨密度,促进骨转换,为进一步明确辛伐他汀对正常大鼠骨代谢的影响,实验选择不同给药周期,进一步验证辛伐他汀对大鼠骨量影响的同时,参照已建立的大鼠骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 体外培养模型体外培养大鼠 BMSCs<sup>[13]</sup>,探讨辛伐他汀对其成骨分化的影响及在此过程中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关因子 LRP-5、Axin2、

<sup>1</sup>Department of Postgraduate, North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China;  
<sup>2</sup>Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Zheng Huan, Lecturer, Department of Postgraduate, North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China  
zhenghuan@163.com

Correspondence to: Zhang Liu, Doctor, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, Department of Postgraduate, North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China; Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China  
zhliu130@sohu.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Hebei Province, No. C2006000580\*

Received: 2009-12-19  
Accepted: 2010-03-01

华北煤炭医学院,  
1 研究生部,<sup>2</sup> 附属  
医院骨外科, 河北  
省唐山市  
063000

郑桓, 男, 1968  
年生, 河北省唐山市  
人, 汉族, 1991  
年华北煤炭医  
学院毕业, 讲师, 从  
事人体解剖学教  
学工作。  
zhenghuan@163  
.com

通讯作者: 张  
柳, 博士, 主任医  
师, 教授, 博士生  
导师, 华北煤炭医  
学院研究生部, 河  
北省唐山市  
063000  
zhlou130@sohu.  
com

中图分类号: R394.2  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225  
(2010)23-04191-04

收稿日期: 2009-12-19  
修回日期: 2010-03-01  
(20091219004/  
W-Q)

$\beta$ -catenin 表达的影响。

## 1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于 2006-09/2008-06 在华北煤  
炭医学院骨科实验室完成。

材料: 清洁以上级 6 周龄雌性 SD 大鼠 36 只,  
(北京维通利华实验动物养殖中心提供, 动物合  
格证号 SCXK(京)2002-0003 号), 体质量 (130±  
20) g。实验过程中对动物处置符合 2006 年科学  
技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意  
见》<sup>[16]</sup>。

### 主要试剂及器材:

主要试剂及器材	来源
DMEM 培养基	Gibco
辛伐他汀(原料药)	浙江江北药业有限公司
碱性磷酸酶检测试剂盒、 考马斯亮蓝试剂盒	南京建成生物制品有限公司
Trizol	Invitrogen
Line-Gene II 荧光定量 PCR 系统(FQD-66A)	杭州博日
M-MLV 反转录试剂盒	BBi 公司
Realtime PCR MasterMix 引物	TOYOBO 公司 由上海生工生物工程 有限公司合成

### 实验过程:

动物分组及处理: 根据体质量随机分成 2 组,  
每组 18 只大鼠。对照组每天用蒸馏水灌胃; 实验  
组辛伐他汀 20 mg/(kg·d) 灌胃, 每周称体质量 2  
次, 根据体质量计算新的给药量。分别于给药后  
3, 6, 9 周处死每组 6 只大鼠, 取左侧股骨行骨密  
度检测, 取右侧股骨和胫骨骨髓细胞体外培养。

骨密度检测: DEXA 测量骨密度: 应用  
Norland-XR36 双能 X 射线骨密度测量仪 (DEXA,  
美国), 测量股骨骨密度 (Bone Mineral Density,  
BMD)。依据骨密度测量仪实际扫描测量的股骨  
长度, 分别测量整体骨密度 (total Bone Mineral  
Density, tBMD), 近端 (上 1/4) 骨密度 (Proximal  
Bone Mineral Density, pBMD), 中段 (中 1/2) 骨  
密度 (middle Bone Mineral Density, mBMD), 远  
端 (下 1/4) 骨密度 (distal Bone Mineral  
Density, dBMD)。

细胞培养: 脱颈处死大鼠并于无菌条件下取  
其右侧股骨和胫骨, 去除附着肌肉和结缔组织。  
用完全 DMEM 培养液 (青霉素 100 U/mL, 链霉素  
100 mg/L, 体积分数 10% 胎牛血清) 反复冲洗骨

髓腔, 收集细胞于离心管中, 1 000 r/min 离心  
10 min, 弃上清, 细胞重悬后反复吹打成单细  
胞悬液, 接种于培养瓶中 (2 瓶/只), 体积分数  
5% 的 CO<sub>2</sub>, 37 °C 温箱中培养。24 h 后换液,  
以后每两三天更换培养液, 弃掉未贴壁的悬浮  
细胞。细胞大致融汇至 80% 后加入条件培养  
基, 向成骨细胞 (维生素 C 50 mg/L,  $\beta$ -甘油磷  
酸钠 10 mmol/L, 地塞米松 10<sup>-8</sup> mol/L) 诱导分  
化, 细胞融汇成致密单层后消化、计数并分别接  
种于培养瓶、96 孔板、12 孔板、6 孔板和 35 mm  
培养皿中。

Real-time RT-PCR: BMSCs 在体外诱导培  
养 21 d 后, 采用 Trizol 一步法提取细胞总  
RNA, RNA 定量后反转录合成第一链 cDNA  
后, 用 LINE-GENE II 荧光定量 PCR 系统  
(FQD-66A, 杭州博日) 进行 PCR 反应, 内参基  
因 GAPDH 与待测基因同批扩增, 梯度稀释内  
参基因法制定相对标准曲线, 根据扩增产物  
的 Ct 值 (扩增产物的荧光信号达到设定的阈值  
时所经过的扩增循环次数) 及相对标准曲线求  
出各标本所含该基因的模板量, 并与其内参  
基因量作比, 以比值作为最终统计数据。采用  
溶解曲线法和凝胶电泳法鉴定产物特异性和  
片段大小。PCR 反应体系: 总体积 50  $\mu$ L,  
包括: Realtime PCR MasterMix 25  $\mu$ L, 引物  
(10  $\mu$ mol/L) 各 2  $\mu$ L, cDNA 模板 5  $\mu$ L。PCR 反应  
条件: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min; 95 °C 15 s,  
60 °C 1 min, 45 个循环。

### 引物序列:

Gene		Primer	Product length (bp)
GAPDH	Sense	5'-TGC TGA GTA TGT CGT GGA G-3'	288
	Antisense	5'-GTC TTC TGA GTG GCA GTG AT-3'	
LRP-5	Sense	5'-GAT ACA GGC ACT GAC AGA ATT G-3'	312
	Antisense	5'-CCG CTT TGT CCC GTC TAT-3'	
$\beta$ -catenin	Sense	5'-CTG AGA AAC TTG TCC GAT GC-3'	384
	Antisense	5'-TCC AAC AGT TGC CTT TAT CA-3'	
Axin2	Sense	5'-AAA CAG ACG ACG AAG CAC G-3'	426
	Antisense	5'-GGC AGA CTC CAA CGG GTA-3'	

细胞碱性磷酸酶比活性测定: 细胞培养第 16

天, 12孔板中的细胞消化、离心收集, 加入细胞裂解缓冲液(Tri-Hcl,pH7.5,含0.1%Triton X-100) 400  $\mu$ L, 超声波破碎细胞, 4  $^{\circ}$ C离心取上清用碱性磷酸酶试剂盒检测细胞碱性磷酸酶活性; 考马斯亮蓝测定盒行蛋白定量。用碱性磷酸酶活性数值比蛋白量, 得到细胞碱性磷酸酶比活性数值。

**碱性磷酸酶染色:** 成骨组细胞诱导培养第16天, 采用磷酸萘酚AS-MX, 固定TR法, 作碱性磷酸酶染色, 细胞核染为红棕色, 碱性磷酸酶阳性细胞胞浆为蓝色。染色方法如下: 滴加孵育液37  $^{\circ}$ C孵育2 h, 流水冲洗2 min, 晾干。滴加适量复染液, 复染5 min, 流水冲洗2 min, 晾干。

**主要观察指标:** ①左侧股骨行骨密度测定。②右侧股骨和胫骨骨髓细胞向成骨方向诱导培养, 并作如下检测: 细胞培养第16天和28天分别检测碱性磷酸酶比活性、碱性磷酸酶染色和von Kossa染色; 细胞培养第21天, 提取总RNA, 采用Real-time RT-PCR检测LRP-5、Axin2、 $\beta$ -catenin的mRNA的表达。

**设计、实施、评估者:** 设计为通讯作者和第一作者, 全体作者负责实施和评估。

**统计学分析:** 实验数据建立EXCEL数据库, 资料用  $t$  检验来处理。实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  表示差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 骨密度检测结果** 两组各时间点各段骨密度差异均无显著性意义( $P > 0.05$ )。见表1。

Time	Group	Total BMD	Proximal BMD
3 wk	Control	0.127 3 $\pm$ 0.003 5	0.128 5 $\pm$ 0.008 2
	Experimental	0.129 7 $\pm$ 0.008 3	0.135 9 $\pm$ 0.008 3
6 wk	Control	0.184 3 $\pm$ 0.005 2	0.188 1 $\pm$ 0.008 8
	Experimental	0.184 3 $\pm$ 0.003 5	0.184 9 $\pm$ 0.004 3
9 wk	Control	0.188 0 $\pm$ 0.003 7	0.187 5 $\pm$ 0.004 3
	Experimental	0.187 5 $\pm$ 0.004 3	0.184 6 $\pm$ 0.008 9

  

Time	Group	Distal BMD	Middle BMD
3 wk	Control	0.121 5 $\pm$ 0.005 7	0.148 2 $\pm$ 0.010 1
	Experimental	0.120 0 $\pm$ 0.011 8	0.151 2 $\pm$ 0.010 9
6 wk	Control	0.180 7 $\pm$ 0.004 6	0.185 2 $\pm$ 0.012 4
	Experimental	0.177 6 $\pm$ 0.006 0	0.192 0 $\pm$ 0.006 9
9 wk	Control	0.182 9 $\pm$ 0.003 9	0.194 8 $\pm$ 0.006 0
	Experimental	0.183 4 $\pm$ 0.006 8	0.195 0 $\pm$ 0.013 2

**2.2 碱性磷酸酶比活性及染色结果** 两组各时间点碱性磷酸酶比活性、碱性磷酸酶染色阳性细胞(胞浆蓝黑色)比例差异均无显著性意义( $P > 0.05$ )。见表2。

表2 两组各时间点骨髓间充质干细胞中碱性磷酸酶表达  
Table 2 Alkaline phosphatase (ALP) expression in bone marrow mesenchymal stem cells at various time points in both groups ( $\bar{x} \pm s$ )

Time	Group	ALP activity (nkat/g)	ALP-positive cell rate (%)
3 wk	Control	1 068 $\pm$ 189	0.28 $\pm$ 0.12
	Experimental	1 146 $\pm$ 183	0.31 $\pm$ 0.09
6 wk	Control	1 086 $\pm$ 171	0.29 $\pm$ 0.14
	Experimental	1 126 $\pm$ 196	0.35 $\pm$ 0.17
9 wk	Control	1 106 $\pm$ 187	0.31 $\pm$ 0.14
	Experimental	1 158 $\pm$ 172	0.32 $\pm$ 0.11

**2.3 Realtime RT-PCR检测结果** 两组各时间点所有检测基因mRNA表达水平组间比较差异均无显著性意义( $P > 0.05$ )。见表3。

表3 两组各时间点 Real-time PCR 检测结果  
Table 3 Results of real-time PCR at various time points in both groups ( $\bar{x} \pm s$ )

Time	Group	LRP-5 ( $\times 10^{-5}$ )	$\beta$ -catenin ( $\times 10^{-3}$ )	Axin2 ( $\times 10^{-5}$ )
3 wk	Control	6.28 $\pm$ 0.62	1.77 $\pm$ 0.52	2.66 $\pm$ 0.73
	Experimental	5.98 $\pm$ 0.54	1.80 $\pm$ 0.81	2.53 $\pm$ 0.59
6 wk	Control	6.77 $\pm$ 0.25	1.98 $\pm$ 0.68	2.23 $\pm$ 0.61
	Experimental	6.75 $\pm$ 0.50	1.89 $\pm$ 0.75	2.16 $\pm$ 0.68
9 wk	Control	6.96 $\pm$ 0.47	2.34 $\pm$ 0.66	2.41 $\pm$ 0.50
	Experimental	6.99 $\pm$ 0.48	2.11 $\pm$ 0.71	2.49 $\pm$ 0.42

## 3 讨论

Sonobe等<sup>[17]</sup>在以地塞米松( $10^{-8}$  mol/L)为阳性对照的前提下, 同时检测3种相同剂量他汀类药物对体外培养大鼠BMSCs的作用并发现, 3种他汀类药物均不能显著增强基质矿化、碱性磷酸酶活性及骨钙素的表达。Maritz等<sup>[15]</sup>分析了灌胃给药12周3种他汀类药物及不同剂量的辛伐他汀对正常和去卵巢大鼠骨密度及骨量的影响, 结果发现: 他汀类药物降低鼠的骨密度, 高剂量[20 mg/(kg·d)]的辛伐他汀同时刺激骨形成和骨吸收, 而在去卵巢大鼠无类似发现, 辛伐他汀对骨转换和骨代谢确实有刺激作用, 但不能阻止去卵巢大鼠骨量的丢失。部分临床研究也未能发现辛伐他汀对骨代谢的有益作用<sup>[12]</sup>。本实验采用不同给药周期研究发现用20 mg/(kg·d)辛伐他汀口服给药3, 6, 9周均不能显著影响大鼠骨量, 表现在: 两组间大鼠股骨各段骨密度差异均无显著性意义, 股骨远端骨组织形态计量学观察差异亦无显著性意义, 骨形成和骨吸收的参数都较低, 骨转换不活跃, 骨量稳定。BMSCs具有多向分化潜能, 其增殖与分化尤其是向成骨细胞分化功能和活性的变化最终会影响局部骨代谢进而改变骨量。在BMSCs向成骨细胞分化过程中, 有若干相关信号传导途径参与, 以往的

研究多侧重于转化生长因子 $\beta$ 信号传导途径<sup>[18]</sup>, 而最新研究证实Wnt信号途径和成骨细胞的分化以及骨折的愈合密切相关<sup>[19-21]</sup>。Wnt蛋白家族是由Wnt基因编码的一类信号分子, 这类基因编码一组富含半胱氨酸的分泌型糖蛋白, 构成Wnt分子家族。Wnt受体是存在于细胞膜上的一类7次跨膜受体, 称frizzled受体家族, LRP-5与其组成共受体。Wnt蛋白与frizzled受体结合后, 将信号传入细胞内。Wnt/ $\beta$ -catenin途径称为“经典途径”<sup>[22]</sup>。 $\beta$ -catenin是存在于细胞浆内的一类大分子, 缺乏Wnt信号刺激时, 其被降解; 当Wnt蛋白和frizzled受体结合后, Wnt信号途径激活, 通过一系列反应抑制其降解, 使其在胞浆内的浓度升高, 并进入细胞核内, 与转录因子(包括Lef-1)结合后调控目的基因的转录<sup>[23-26]</sup>。Axin可存在于许多生物体内, 参与构成 $\beta$ -catenin降解复合物, 目前发现Axin家族有两个成员, Axin(Axin1)及其同源物Axil(Axin like), 又称conductin或Axin2<sup>[27-28]</sup>。而本研究中辛伐他汀体内给药后, 大鼠BMSCs中LRP-5、Axin2、 $\beta$ -catenin的表达均为发生显著变化。综上所述, 辛伐他汀[20 mg/(kg·d)]灌胃3, 6, 9周, 均不能显著影响正常大鼠骨量及BMSCs的成骨分化。一方面, 口服辛伐他汀经代谢后到达骨组织的药物浓度太低, 作用较弱, 这可能是包括本实验在内众多动物实验未能发现辛伐他汀成骨潜能的主要原因之一; 另外, 如不能改进辛伐他汀的药代特性, 辛伐他汀在骨代谢领域的研究和应用应以其他给药方式, 如局部缓释材料或者生物涂层内固定治疗骨折/缺损等为主<sup>[29]</sup>, 应用前景也更为乐观。

#### 4 参考文献

- [1] Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*.1999; 286(5446): 1946-1949.
- [2] Song CL, Guo ZQ, Ma QJ, et al. Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bonemarrow stromal cells. *Biochem Biopsy Res Commun*.2003; 308(3): 458-462.
- [3] Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, et al. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*.2001; 280(3): 874-877.
- [4] Baek KH, Lee WY, Oh KW, et al. The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Korean Med Sci*. 2005; 20(3): 438-444.
- [5] Zheng J, Zhang L, Han DC. *Zhongguo Guzhi Shusong Zazhi*.2008; 14(9): 654-658.  
郑杰, 张柳, 韩大成. 辛伐他汀体内给药部分阻止大鼠去卵巢导致的骨丢失[J]. *中国骨质疏松杂志*. 2008; 14(9): 654-658.
- [6] Wang JW, Xu SW, Yang DS, et al. Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat. *Osteoporos Int*. 2007;18:1641-1650.
- [7] Serin-Kilicoglu S, Erdemli E. New Addition to the Statin's Effect. *J Trauma*. 2007;63: 187-191.
- [8] Nyan M, Sato D, Oda M, et al. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. *J Pharmacol Sci*. 2007;104:384-386.
- [9] Wu Z, Liu C, Zang G, et al. The effect of simvastatin on remodelling of the alveolar bone following tooth extraction. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008;37:170-176.
- [10] Seto H, Ohba H, Tokunaga K, et al. Topical administration of simvastatin recovers alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res*.2008;43:261-267.
- [11] Anbinder AL, Prado Fde A, Prado Mde A, et al. The influence of ovariectomy, simvastatin and sodium alendronate on alveolar bone in rats. *Braz Oral Res*. 2007;21:247-252.
- [12] Sondergaard T, Pedersen P, Andersen T, et al. A phase II clinical trial does not show that high dose simvastatin has beneficial effect on markers of bone turnover in multiple myeloma. *Hematol Oncol*. 2009;27:17-22.
- [13] Pytlík M, Janiec W, Misiarz-Myrta M, et al. Effects of simvastatin on the development of osteopenia caused by ovariectomy in rats. *Pol J Pharmacol*.2003; 55(1): 63-71.
- [14] Oxlund H, Andreassen TT. Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone loss while increasing cortical bone formation. *Bone*.2004; 34(4): 609-618.
- [15] Maritz FJ, Conradie MM, Hulley PA, et al. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21(10): 1636 - 1641.
- [16] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.  
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [17] Sonobe M, Hattori K, Tomita N, et al. Stimulatory effects of statins on bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Study of a new therapeutic agent for fracture. *Biomed Mater Eng*.2005; 15(4): 261-267.
- [18] Wong RW, Rabie AB. Statin-induced osteogenesis uses in orthodontics : a scientific review. *World J Orthod*. 2006; 7(1): 35-40.
- [19] Shahnazari M, Yao W, Corr M, et al. Targeting the Wnt signaling pathway to augment bone formation. *Curr Osteoporos Rep*. 2008; 6(4): 142-148.
- [20] Silkstone D, Hong H, Alman BA. Beta-catenin in the race to fracture repair: in it to Wnt. *Nat Clin Pract Rheumatol*.2008; 4(8): 413-419.
- [21] Zhang L, Zhang L, Tian FM, et al. *Zhongguo Xiufu Chongjian Waikes Zazhi*. 2009;23(11): 1371-1375.  
张磊, 张柳, 田发明, 等. 辛伐他汀对大鼠BMSCs成骨诱导Wnt信号传导通路相关因子mRNA表达的影响[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2009, 23(11): 1371-1375.
- [22] Joerg H, Walter B. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin in Genet Dev*.2001;11(5): 547-553.
- [23] Sakanaka C, Leong P, Xu L, et al. Casein kinase Iepsilon in the wnt pathway: regulation of beta-catenin function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(22): 12548-12552.
- [24] Behrens J, Jerchow BA, Wuertele M, et al. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC and GSK3b. *Science*.1998; 280(5363): 596-599.
- [25] Behrens J, Von Kries JP, Kuhl M, et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*.1996; 382(6592): 638-642.
- [26] DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*.2000; 8(5): 309-334.
- [27] Thomas DM, Carty SA, Piscopo DM, et al. The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Mol Cell*. 2001; 8(5): 303-316.
- [28] Bo L, Hsiao-Man IY, Wei H. Craniosynostosis caused by Axin2 deficiency is mediated through distinct functions of  $\beta$ -catenin in proliferation and differentiation. *Dev Biol*.2007;301:298-308.
- [29] Pauly S, Luttsch F, Morawski M, et al. Simvastatin locally applied from a biodegradable coating of osteosynthetic implants improves fracture healing comparable to BMP-2 application. *Bone*. 2009; 45(3):505-511.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 河北省自然科学基金(C2006000580)资助, 课题为辛伐他汀促进骨形成机制的研究。

**利益冲突:** 无利益冲突。

**课题创新点:** 目前对于辛伐他汀促骨形成的作用潜能尚存争议, 尤其在体内实验中。实验从分子水平观察辛伐他汀体内给药对正常大鼠 BMSCs 增殖分化的影响, 目前国内外罕见报道。

**课题设计的偏倚与不足:** 虽然药物剂量选择系参照国内外以往研究, 但仍显单一; 另外, 虽然组织学观察结果显示该剂量和作用时间下, 辛伐他汀不能显著影响正常大鼠骨量, 但分子水平的作用效果仅从 Wnt 信号通路着手, 该类检测指标尚有待丰富。

**提供临床借鉴的价值:** 目前对辛伐他汀成骨潜能及其作用机制的研究多以动物实验为主, 其临床用于骨代谢疾病的治疗尚需更深入的研究和证实, 相信通过改变剂型或作用途径, 辛伐他汀作为促骨形成药物用于临床的前景会更加乐观。