

辛伐他汀对成骨细胞增殖分化及连接蛋白43表达的调控

王国亮, 蔡湘波, 李文壮, 罗胜明, 陈泽雁, 陈戈胜(广州开发区医院暨中国医药生物技术协会南方生物诊疗中心骨科, 广东省广州市510730)

文章亮点:

- 1 颅盖骨消化法培养大鼠成骨细胞, 并采用不同浓度辛伐他汀(0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$)对成骨细胞进行处理, 观察不同浓度辛伐他汀对成骨细胞连接蛋白 43 表达的影响。
- 2 实验结果发现辛伐他汀上调成骨细胞连接蛋白 43 的 mRNA 和蛋白表达, 其中 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组作用对成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响最为显著。说明辛伐他汀可能通过上调成骨细胞连接蛋白 43 的 mRNA 和蛋白表达, 去影响成骨细胞的增殖和分化情况。

关键词:

组织构建; 骨组织工程; 辛伐他汀; 成骨细胞; 骨质疏松症; 间隙连接蛋白 43; 增殖; 分化

主题词:

激肽原类; 成骨细胞; 骨质疏松; 连接蛋白 43; 细胞增殖

基金资助:

广州市医药卫生科技项目(20121A011189)

摘要

背景: 辛伐他汀对成骨细胞增殖分化的影响以及分子机制尚不完全明了, 尤其对连接蛋白 43 的作用知之甚少。

目的: 探讨辛伐他汀对成骨细胞增殖分化及成骨基因和连接蛋白 43 表达的调控作用。

方法: 选取新生 SD 大鼠, 采用颅盖骨消化法培养成骨细胞。采用不同浓度辛伐他汀(0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$)处理成骨细胞, MTT 检测辛伐他汀对成骨细胞增殖作用的影响; 碱性磷酸酶活性检测辛伐他汀对成骨细胞分化作用的影响; 实时定量 RT-PCR 和免疫印迹检测细胞成骨基因和间隙连接蛋白 43 mRNA 和蛋白的表达。

结果与结论: 细胞培养第 3 天, 辛伐他汀组各浓度组 MTT 吸光度值比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 但是培养第 4 天和第 5 天, 辛伐他汀各浓度组 MTT 吸光度值低于对照组($P < 0.05$)。通过不同浓度辛伐他汀处理成骨细胞后, 与对照组比较, 成骨细胞碱性磷酸酶活性增加($P < 0.05$), 且 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组作用对成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响最为显著。采用 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀处理成骨细胞后, 辛伐他汀组与对照组比较, 成骨细胞骨钙蛋白、碱性磷酸酶、I 型胶原和连接蛋白 43 mRNA 和蛋白表达均增加($P < 0.05$)。提示辛伐他汀可能通过上调成骨基因和间隙连接蛋白 43 mRNA 和蛋白的表达来抑制成骨细胞增殖和促进其分化, 这为他汀类药物治疗骨质疏松症提供新的干预靶点。

王国亮, 蔡湘波, 李文壮, 罗胜明, 陈泽雁, 陈戈胜. 辛伐他汀对成骨细胞增殖分化及连接蛋白 43 表达的调控[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(15):2303-2308.

Regulatory effects of simvastatin on osteoblast proliferation, differentiation and connexin 43 expression

Wang Guo-liang, Cai Xiang-bo, Li Wen-zhuang, Luo Sheng-ming, Chen Ze-yan, Chen Ge-sheng
(Department of Orthopedics, Guangzhou Development District Hospital, i.e., Chinese Association of Medicinal Biotechnology Southern Center of Biology Diagnosis and Therapy, Guangzhou 510730, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: The effects and molecular mechanism of simvastatin on the proliferation and differentiation of osteoblasts remain unclear. Especially, we do not know much about the effects of connexin 43.

OBJECTIVE: To evaluate the effects of simvastatin on the proliferation and differentiation of osteoblasts and the regulatory effect of simvastatin on the expression of osteogenic genes and connexin 43.

METHODS: Newborn Sprague-Dawley rats were chosen and the cranium digestion method was used to culture osteoblasts. The different concentrations of simvastatin (0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0 $\mu\text{mol/L}$) were used to deal with osteoblasts. The proliferative effect of simvastatin on osteoblasts was measured with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide. The effect of simvastatin on osteoblast differentiation was measured with alkaline phosphatase activities. The mRNA and protein expression of osteogenic genes and connexin 43 were measured by real time quantitative RT-PCR and western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: There were no significant differences in absorbance values of simvastatin groups at 3 days ($P > 0.05$). However, at 4 and 5 days, absorbance values were lower in the simvastatin groups

王国亮, 男, 1977 年生, 湖南省永州市人, 汉族, 硕士, 主治医师, 主要从事骨关节疾病的研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.15.002

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)15-02303-06

稿件接受: 2014-03-05

Wang Guo-liang, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, Guangzhou Development District Hospital, i.e., Chinese Association of Medicinal Biotechnology Southern Center of Biology Diagnosis and Therapy, Guangzhou 510730, Guangdong Province, China

Accepted: 2014-03-05

than those in the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, alkaline phosphatase activities of osteoblasts were greater in the simvastatin groups ($P < 0.05$). Moreover, the effects of 0.25 $\mu\text{mol/L}$ simvastatin on alkaline phosphatase activities of osteoblasts were most significant. Osteocalcin, alkaline phosphatase activities, type I collagen and connexin 43 mRNA and protein expressions were increased after treatment with 0.25 $\mu\text{mol/L}$ simvastatin ($P < 0.05$). These results indicated that simvastatin may inhibit the proliferation and improve the differentiation of osteoblasts by upregulating the mRNA and protein expression of osteogenic genes and connexin 43. These data may provide the new intervention target for osteoporosis treated with statins.

Subject headings: kininogens; osteoblasts; osteoporosis; connexin 43; cell proliferation

Funding: the Guangzhou Municipal Medicine and Healthcare Technology Project in China, No. 20121A011189

Wang GL, Cai XB, Li WZ, Luo SM, Chen ZY, Chen GS. Regulatory effects of simvastatin on osteoblast proliferation, differentiation and connexin 43 expression. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(15):2303-2308.

0 引言 Introduction

辛伐他汀是广泛应用于临床的他汀类药物, 可降低血浆胆固醇水平, 有效减少心血管疾病病残率和病死率。他汀类药物可促进骨形成并在动物实验中得到证实, 为临床常见的骨质疏松、骨折愈合不良、脊柱融合术后假关节形成等成骨缺乏病症的治疗提供了最有开发潜力的药物^[1-3]。它可抑制羟甲基戊二酰辅酶A还原酶, 而羟甲基戊酸可阻断荧光素酶活性, 骨的形成作用与此酶的抑制有关^[4]。

间隙连接蛋白通过间隙连接介导细胞间信号通路, 其在骨骼发生发育、塑形中起着重要作用, 它不但可以影响骨骼发育过程, 而且对外界刺激生物信号快速准确地传播至骨组织相应的细胞中, 使骨骼对刺激产生一系列反应。连接蛋白43由长度为2 768碱基对的3条互补cDNA所编码, 该复合cDNA含有一1 146碱基对的开放读码框, 编码成含有378个氨基酸的单肽, 相对分子质量为43 000, 因此命名为连接蛋白43^[5]。连接蛋白43是一种主要的连接蛋白, 最先在心肌组织中被发现, 并且其表达在骨细胞中发现^[4]。

人们发现间隙连接存在于破骨细胞之间、成骨细胞之间、破骨细胞和骨髓来源的单核细胞之间、骨细胞基质与成骨细胞之间, 以及在骨细胞向骨小管延伸处的紧密连接处; 而此间隙连接蛋白主要为连接蛋白43^[6-13]。辛伐他汀对成骨细胞增殖分化的影响以及分子机制尚不完全明了, 尤其对连接蛋白43的作用知之甚少。实验探讨辛伐他汀对大鼠成骨细胞的增殖分化功能和细胞成骨基因和连接蛋白43表达的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 动物实验, 对照观察。

时间及地点: 于2011年至2012年9月在广州医科大学麻醉学系实验室完成。

材料:

实验动物: 新生24 h健康SD大鼠72只, 由广东省医学动物实验中心提供, 许可证号: SCXK(粤)2008-0002, 实验过程中对动物的处置符合伦理学标准。

方法:

成骨细胞培养: 采用颅盖骨消化法培养成骨细胞。取

SD大鼠(新生24 h内)为实验对象, 颈椎脱臼处死, 用眼科剪剪下头部, 分离颅骨, D-Hank液(含青霉素100 U/mL, 链霉素100 U/mL)冲洗, 仔细去除颅骨表面的纤维组织、骨膜组织及血管等软组织。将颅骨剪成1.0 mm×1.0 mm大小的骨片, 送入培养瓶中, 置于体积分数5%CO₂、37 °C CO₂培养箱中。倒置相差显微镜观察细胞贴壁生长情况至细胞长至80%融合时传代培养, 0.25%胰蛋白酶消化细胞, 收集消化所得细胞, 并用差速贴壁法除去成纤维细胞。

辛伐他汀对成骨细胞增殖分化及连接蛋白43表达的调控实验用主要试剂:

试剂	来源
simvastatin	Aladdins 公司
PCR 试剂	美国 Promega 公司
TRIZOL RNA 抽提试剂	美国 Pierce 公司
DMEM 培养基、体积分数 10%FBS	美国 Gibco 公司
引物	海生工生物工程有限公司
4-甲基偶氮四唑蓝(MTT)、胰蛋白酶、二甲亚砜(DMSO)	美国 Santa Cruz 公司
碱性磷酸酶试剂盒	南京建成生物工程研究所

实验分组: 将辛伐他汀溶解于二甲基亚砜(DMSO), 并用DMEM培养液配制5组不同浓度辛伐他汀, 浓度分别为0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5和1.0 $\mu\text{mol/L}$, 对照组培养液中加入等体积不含辛伐他汀的DMSO, 其余同实验组。

MTT检测: 成骨细胞以 $1 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度分别植入96孔板中, 用含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养液中培养24 h后, 采用无血清DMEM培养24 h, 再培养20 h后每孔加入20 μL MTT(5 g/L), 4 h后吸去培养液, 加入DMSO 150 μL , 每组重复6孔, 参考波长630 nm, 采用酶标仪检测570 nm波长时各孔吸光度值。

碱性磷酸酶活性检测: 成骨细胞以 $3 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种到6孔板中, 更换无血清培养基24 h后, 实验组含不同浓度辛伐他汀的无血清DMEM培养24 h后, 对照组使用无血清DMEM培养, 吸弃孔中的培养液, 用D-Hank洗2遍, 每孔加入细胞裂解液(Tri-HCl, pH 7.5, 含0.1% Triton X-100)400 μL , 超声波破碎细胞, 4 °C离心取上清, 采用

BCA法测定裂解液中总蛋白浓度, 采用对硝基酚磷酸盐法测定碱性磷酸酶活性, 用碱性磷酸酶活性数值比蛋白量, 为碱性磷酸酶比活性数值。碱性磷酸酶活性以U/mg蛋白表示。

Real-time RT-PCR: 用0.25 μmol/L辛伐他汀处理成骨细胞4 d后, 采用Trizol法提取细胞总RNA, RNA定量后反转录合成第一链cDNA后, 进行PCR反应, 内参基因为GAPDH, 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连接蛋白43的模板量, 与GAPDH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 μL, 包括: PCR MasterMix 25 μL, 引物(10 μmol/L)各2 μL, cDNA模板5 μL。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。基因引物序列(表1)。

表 1 连接蛋白 43 和成骨基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of connexin 43 and osteogenic genes

基因	引物序列
连接蛋白 43 forward primer	5'-CCT TTG ACT TCA GCC TCC AA-3'
连接蛋白 43 reverse primer	5'-CAT GTC TGG GCA CCT CTC TT-3'
骨钙蛋白 forward primer	5'-AAG CAG GAG GGC AAT AAG GT-3'
骨钙蛋白 reverse primer	5'-TTT GTA GGC GGT CTT CAA GC-3'
碱性磷酸酶 forward primer	5'-GCT GAT CAT TCC CAC GTT TT-3'
碱性磷酸酶 reverse primer	5'-CTG GGC CTG GTA GTT GTT GT-3'
I 型胶原 forward primer	5'-CAG GGA AGC CTC TTT CTC CT-3'
I 型胶原 reverse primer	5'-ACG TCC TGG TGA AGT TGG TC-3'
GAPDH forward primer	5'-CGT GGG GCT GCC CAG AAC AT-3'
GAPDH reverse primer	5'-TCT CCA GGC GGC ACG TCA GA-3'

Western blot: 采用0.25 μmol/L辛伐他汀处理成骨细胞4 d后, 细胞裂解液裂解成骨细胞, 12 000 r/min离心30 min, 取上清, 测定总蛋白含量。细胞蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 100 V电泳转移至PVDF膜上, 脱脂奶粉封闭液封闭2 h, 用骨钙蛋白、碱性磷酸酶、I型胶原和连

接蛋白43抗体4 °C孵育过夜。辣根过氧化物酶偶联的IgG孵育2 h, 采用ECL显影并检测。以GAPDH作为内对照。

主要观察指标: 采用颅盖骨消化法培养成骨细胞, MTT检测辛伐他汀对成骨细胞增殖作用的影响; 碱性磷酸酶活性检测辛伐他汀对成骨细胞分化作用的影响; 实时定量RT-PCR和免疫印迹检测细胞成骨基因和间隙连接蛋白43 mRNA和蛋白的表达。

统计学分析: 所有数值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较采用Student's *t*-test, 多重比较采用方差分析, 统计分析均采用SPSS 17.0软件, *P* < 0.05为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 辛伐他汀对细胞增殖的影响 根据MTT数据分析, 与对照组比较, 细胞培养第3天, 辛伐他汀各浓度组MTT吸光度值比较, 差异无显著性意义(*P* > 0.05), 说明辛伐他汀对成骨细胞无明显促增殖效应; 而在成骨细胞培养第4, 5天, 不同浓度辛伐他汀组MTT吸光度值比较, 差异有显著性意义(*P* < 0.05), 辛伐他汀各浓度组MTT吸光度均值小于对照组, 说明辛伐他汀对成骨细胞的增殖具有抑制作用(表2)。

2.2 辛伐他汀对成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响 与对照组比较, 不同浓度辛伐他汀组的A值均升高, 差异有显著性意义(*P* < 0.05), 提示辛伐他汀能够增强成骨细胞碱性磷酸酶活性, 其中0.250 μmol/L辛伐他汀组对成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响最为显著(表2)。

2.3 辛伐他汀对成骨细胞成骨基因和连接蛋白43 mRNA表达的影响 采用0.25 μmol/L辛伐他汀处理成骨细胞后, 辛伐他汀组与对照组比较, 成骨细胞骨钙蛋白、碱性磷酸酶、I型胶原和连接蛋白43 mRNA表达差异均有显著性意义(*P* < 0.05), 提示辛伐他汀能够提高成骨细胞骨钙蛋白、碱性磷酸酶、I型胶原和连接蛋白43的mRNA表达, 因此说明0.25 μmol/L浓度组作用成骨细胞, 通过上调成骨细胞成骨基因和连接蛋白43 mRNA表达, 来影响成骨细胞增殖或分化(图1)。

表 2 不同浓度辛伐他汀对大鼠成骨细胞增殖及成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响

Table 2 Effects of simvastatin with different concentrations on rat osteoblast proliferation and alkaline phosphatase activities in osteoblasts ($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

组别	MTT 吸光度值			碱性磷酸酶的吸光度值
	第 3 天	第 4 天	第 5 天	
对照组	0.639±0.023	0.695±0.015	0.717±0.019	0.520±0.021
辛伐他汀组				
0.062 5 μmol/L	0.640±0.013	0.689±0.024 ^a	0.696±0.025 ^a	0.640±0.015 ^a
0.125 μmol/L	0.631±0.018	0.677±0.028 ^a	0.685±0.032 ^a	0.659±0.018 ^a
0.250 μmol/L	0.628±0.016	0.655±0.029 ^a	0.652±0.020 ^a	0.678±0.016 ^a
0.500 μmol/L	0.625±0.026	0.636±0.034 ^a	0.645±0.017 ^a	0.665±0.026 ^a
1.000 μmol/L	0.623±0.010	0.632±0.032 ^a	0.641±0.022 ^a	0.653±0.010 ^a

表注: 不同浓度辛伐他汀组比较差异无显著性意义; 在成骨细胞培养第 4 和 5 天, 不同浓度辛伐他汀 MTT 吸光度均值小于对照组。而辛伐他汀能够增强成骨细胞碱性磷酸酶活性, 其中 0.250 μmol/L 辛伐他汀组对成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响最为显著。与对照组相比, ^a*P* < 0.05。

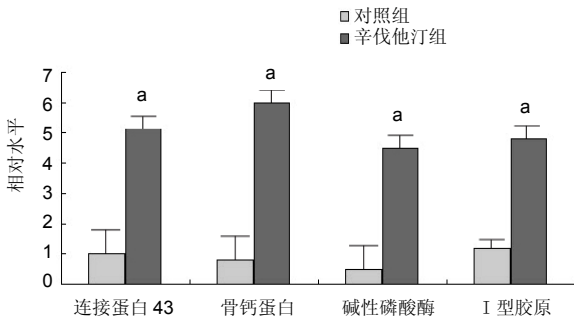


图 1 辛伐他汀对大鼠成骨基因和连接蛋白 43 mRNA 表达的影响
Figure 1 Effects of simvastatin on osteogenic genes and connexin 43 mRNA expression in rats

图注: 采用 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀处理成骨细胞后, 成骨细胞骨钙蛋白、碱性磷酸酶、I 型胶原和连接蛋白 43 mRNA 表达均显著增加。说明 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组作用成骨细胞, 通过上调成骨细胞成骨基因和连接蛋白 43 mRNA 表达, 来影响成骨细胞增殖或分化。与对照组比较, $^aP < 0.05$ 。

2.4 辛伐他汀对成骨细胞成骨基因和连接蛋白 43 蛋白表达的影响 通过 Western blot 技术, 采用 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀处理成骨细胞后, 辛伐他汀组与对照组比较, 成骨细胞骨钙蛋白、碱性磷酸酶、I 型胶原和连接蛋白 43 蛋白表达差异均有显著性意义 ($P < 0.05$), 提示辛伐他汀能够提高成骨细胞骨钙蛋白、碱性磷酸酶、I 型胶原和连接蛋白 43 的蛋白表达, 因此说明 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组作用成骨细胞, 通过上调成骨细胞成骨相关蛋白和连接蛋白 43 蛋白表达, 来影响成骨细胞增殖或分化(图 2)。

3 讨论 Discussion

目前他汀类药物在临床上主要是用于降低胆固醇, 治疗高脂血症, 从而达到控制心血管疾病。人们发现降血脂药他汀类药物能特异性增加成骨细胞骨形态发生蛋白 2 表达, 并且可以刺激骨的形成, 说明其能预防骨质疏松症及骨折发生, 因此具有一定的临床应用潜力^[14-19]。辛伐他汀影响成骨细胞增殖、分化和凋亡等过程中的分子机制, 尤

其对间隙连接蛋白连接蛋白 43 在其对成骨细胞影响中发挥的作用机制尚不清楚。

在外界信息刺激下, 通过细胞自身调控系统的作用而进行细胞增殖的调控。细胞内调控信息是由一些离子和小分子物质传递的, 它们在细胞间的流动受到间隙连接精细调控。生长抑制信息通过间隙连接从生长静止细胞传到生长活跃细胞, 达到一定阈值后, 停止生长; 而将生长刺激信息从生长活跃细胞传到临近细胞, 使生长刺激分子在更大的细胞群体中分布, 其浓度逐渐稀释, 低于阈值时, 生长停止。实验研究辛伐他汀对成骨细胞增殖的影响, 采用 MTT 法检测细胞增殖情况。MTT 可以在代谢活跃细胞内被线粒体琥珀酸脱氢酶还原为不溶于水的蓝紫色结晶物, 并沉积在细胞中, 间接反映活细胞数量, 是测定细胞增殖水平的一个可靠指标。实验经 MTT 检测发现, 各浓度辛伐他汀实验组 MTT 值均有降低, 与对照组比较差异有显著性意义, 说明辛伐他汀抑制成骨细胞增殖。

碱性磷酸酶是成骨细胞分化的早期指标之一, 其表达随着细胞分化的发展而加强, 代表骨形成的状况, 表明细胞分化和骨组织形成的开始。因此碱性磷酸酶增高在体外实验中可作为成骨细胞分化的指标。骨钙蛋白又称骨 γ -羧基谷氨酸蛋白 (bone γ -carboxyglutamic acid, BGP), 是成骨细胞分化时所分泌的一种非胶原蛋白, 是成骨细胞产生的一类多肽物质。其活性大小在一定程度上反映成骨细胞分化程度和功能状况。骨钙蛋白检测常可间接反映骨的合成代谢。I 型胶原是成骨细胞分泌基质中的主要定型成分之一, 占骨有机基质的 90% 以上, 是细胞附着和钙盐沉着的支架。因此 I 型胶原是成骨细胞晚期分化的指标。骨钙蛋白、碱性磷酸酶和 I 型胶原是成骨细胞的标志性分子, 骨钙蛋白、碱性磷酸酶和 I 型胶原水平的升高是成骨细胞向骨细胞转化和成骨细胞成骨功能的标志^[20-21]。实验结果显示辛伐他汀能够促进成骨细胞碱性磷酸酶活性, 其中辛伐他汀 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组作用对成骨细胞碱性磷酸酶活性的影

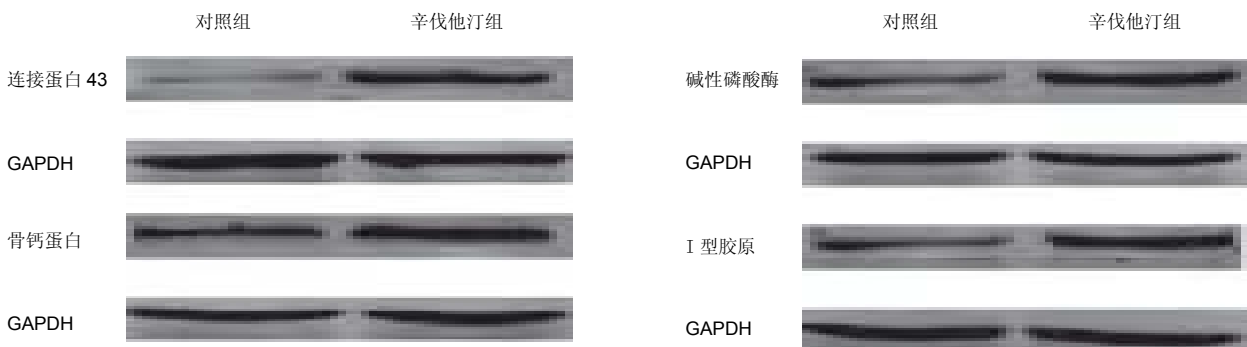


图 2 Western blot 技术检测辛伐他汀对成骨基因和连接蛋白 43 蛋白表达的影响
Figure 2 Western blot assay for the effects of simvastatin on osteogenic genes and connexin 43 protein expression

图注: 采用 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀处理成骨细胞后, 成骨细胞骨钙蛋白、碱性磷酸酶、I 型胶原和连接蛋白 43 的蛋白表达强于对照组。说明 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组作用成骨细胞, 通过上调成骨细胞成骨基因和连接蛋白 43 的蛋白表达, 来影响成骨细胞增殖或分化。

响最为显著。并且发现辛伐他汀能够提高成骨细胞成骨标志物骨钙蛋白、碱性磷酸酶和I型胶原mRNA和蛋白水平的表达, 可以刺激成骨细胞产生大量的骨钙蛋白、碱性磷酸酶和I型胶原, 这说明辛伐他汀既可以刺激成骨细胞的早期分化, 也可以刺激其晚期分化。

物理信号特别是力负载在骨转换中起重要作用, 而骨组织中的细胞成分是对其周围环境的刺激作出反应的基本结构单位, 它们在受刺激后通过结构和功能的调整从而作出反应, 然而力负载通过什么途径对细胞群体产生作用, 骨细胞对力负载引起的顺式反应机制至今令人困惑^[22-23]。近来研究发现, 骨的重建与细胞间隙连接蛋白基因表达和信号转导机制变化以及间隙连接胞间通讯功能调整密切相关^[24]。同时, 胞间连接蛋白又受着许多生长因子等等的调控, 这些作用因素通过影响连接蛋白, 进而调节骨组织中各种细胞的数量, 影响细胞代谢等活动, 使骨组织发生相应改变^[25]。成骨细胞连接蛋白43是骨内细胞网络中成骨细胞间代谢活动所必需的, 连接蛋白43直接调节成骨细胞间通讯, 连接蛋白43接受刺激后可改变骨钙蛋白和I型胶原基因水平的表达^[26-29]。在连接蛋白43突变老鼠身上发现早发性骨量减少^[30], 并且在缺失成骨细胞连接蛋白43的小鼠接受3周后肢悬挂机械卸载力训练后, 与对照组比较, 其骨形成标志物P1NP和硬骨素sclerostin表达降低, 因此抑制皮质骨形成^[31]。吕海宏等^[32]研究了去卵巢致骨质疏松大鼠骨细胞中间隙连接蛋白43的表达及意义, 30只大鼠随机分为去卵巢组、假手术组和尼尔雌醇治疗组, 于术后8周末测量3组大鼠全身及腰椎骨密度(BMD), 采用放免法测定血清雌二醇水平, 采用SABC免疫组化法观察连接蛋白43在成骨细胞和破骨细胞中的表达情况。结果各项指标假手术组和尼尔雌醇治疗组差异无显著性意义, 实验认为去卵巢大鼠连接蛋白43在成骨细胞中表达下降, 而在破骨细胞中表达增加, 在成骨和破骨细胞中连接蛋白43表达的变化可能是去卵巢大鼠发生骨质疏松的机制之一。

在老年患者, 由于氧化应激引起的骨细胞死亡是损害骨质量和骨丢失的主要原因之一, 人们发现H₂O₂可以引起成骨细胞死亡, 并且引起剂量依赖性的连接蛋白43表达减少^[33], 因此作者推测辛伐他汀可能通过减轻成骨细胞的氧化应激水平来调控连接蛋白43的表达。连接蛋白43siRNA或缝隙连接的化学抑制剂抑制成骨细胞连接蛋白43的表达, 可以上调凋亡信号通路蛋白caspase-3、破骨细胞生成信号通路蛋白RANK和骨形成信号通路蛋白Sost/sclerostin表达^[34]。而且人们发现成骨细胞连接蛋白43的表达通过调控Runx2来影响对成纤维细胞生长因子2的反应性, 而这是通过激活PKC δ 信号级联反应产生的^[35-36]。

实验发现辛伐他汀上调成骨细胞连接蛋白43的mRNA和蛋白表达, 说明辛伐他汀可能通过上调成骨细胞连接蛋白43的mRNA和蛋白表达, 去影响成骨细胞的增殖和分化

情况。本实验研究发现辛伐他汀可能通过上调成骨基因和连接蛋白43表达, 抑制成骨细胞的增殖, 促进成骨细胞分化, 从而为探索他汀类药物对成骨细胞的调节机制提供新的依据, 为他汀类药物治疗骨质疏松症提供理论依据和新的干预靶点。

致谢: 感谢广州医科大学麻醉学系实验室提供支持。

作者贡献: 实验设计者为第一作者, 实施者为第一、四作者, 资料收集为第五、六作者, 审校者为第二、三作者, 均经过正规培训。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 成骨细胞连接蛋白43是骨内细胞网络中成骨细胞间代谢活动所必需的, 连接蛋白43直接调节成骨细胞间通讯, 连接蛋白43接受刺激后可改变骨钙蛋白和I型胶原基因水平的表达。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Liu J, Zhu LP, Yang XL, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) and bone mineral density: a meta-analysis. *Bone*. 2013;54(1):151-156.
- [2] Chou J, Ito T, Otsuka M, et al. Simvastatin-loaded β -TCP drug delivery system induces bone formation and prevents rhabdomyolysis in OVX mice. *Adv Healthc Mater*. 2013;2(5):678-681.
- [3] Lübbecke A, Garavaglia G, Rothman KJ, et al. Statins may reduce femoral osteolysis in patients with total Hip arthroplasty. *J Orthop Res*. 2013;31(5):814-820.
- [4] Song YN, Zhang H, Zhao JY, et al. Connexin 43, a new therapeutic target for cardiovascular diseases. *Pharmazie*. 2009;64(5):291-295.
- [5] Johnstone S, Isakson B, Locke D. Biological and biophysical properties of vascular connexin channels. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2009;278:69-118.
- [6] Plotkin LI, Bellido T. Beyond gap junctions: Connexin43 and bone cell signaling. *Bone*. 2013;52(1):157-166.
- [7] Ton QV, Iovine MK. Determining how defects in connexin43 cause skeletal disease. *Genesis*. 2013;51(2):75-82.
- [8] Rosendaal M, Krenács T. Regulatory pathways in blood-forming tissue with particular reference to gap junctional communication. *Pathol Oncol Res*. 2000;6(4):243-249.
- [9] Ren J, Wang XH, Wang GC, et al. 17 β estradiol regulation of connexin 43-based gap junction and mechanosensitivity through classical estrogen receptor pathway in osteocyte-like MLO-Y4 cells. *Bone*. 2013;53(2):587-596.
- [10] Plotkin LI, Bellido T. Beyond gap junctions: Connexin43 and bone cell signaling. *Bone*. 2013;52(1):157-266.
- [11] Loiselle AE, Jiang JX, Donahue HJ. Gap junction and hemichannel functions in osteocytes. *Bone*. 2013;54(2):205-212.
- [12] Ton QV, Iovine MK. Determining how defects in connexin43 cause skeletal disease. *Genesis*. 2013;51(2):75-82.

- [13] Grimston SK, Watkins MP, Brodt MD, et al. Enhanced periosteal and endocortical responses to axial tibial compression loading in conditional connexin43 deficient mice. *PLoS One*. 2012;7(9):e44222.
- [14] Bauer DC. HMG CoA reductase inhibitors and the skeleton: a comprehensive review. *Osteoporos Int*. 2003;14(4): 273-282.
- [15] Rivera C, Monsalve F, Salas J, et al. Platelet-rich plasma, plasma rich in growth factors and simvastatin in the regeneration and repair of alveolar bone. *Exp Ther Med*. 2013;6(6):1543-1549.
- [16] Tai IC, Fu YC, Wang CK, et al. Local delivery of controlled-release simvastatin/ PLGA/HAp microspheres enhances bone repair. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:3895-3905.
- [17] Nakashima Y, Haneji T. Stimulation of Osteoclast Formation by RANKL Requires Interferon Regulatory Factor-4 and Is Inhibited by Simvastatin in a Mouse Model of Bone Loss. *PLoS One*. 2013;8(9):e72033.
- [18] Sadiasa A, Kim MS, Lee BT. Poly(lactide-co-glycolide acid)/biphasic calcium phosphate composite coating on a porous scaffold to deliver simvastatin for bone tissue engineering. *J Drug Target*. 2013;21(8):719-729.
- [19] George MD, Owen CM, Reinhardt AL, et al. Effect of simvastatin injections on temporomandibular joint inflammation in growing rats. *J Oral Maxillofac Surg*. 2013; 71(5):846-853.
- [20] Kim HK, Cho SG, Kim JH, et al. Mevinolin enhances osteogenic genes (ALP, type I collagen and osteocalcin), CD44, CD47 and CD51 expression during osteogenic differentiation. *Life Sci*. 2009;84(9-10):290-295.
- [21] Jeong HM, Jin YH, Choi YH, et al. Risedronate increases osteoblastic differentiation and function through connexin43. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;432(1):152-156.
- [22] 崔燎, 陈槐卿. 骨细胞间隙连接与物理-生物信号传导研究进展 [J]. *国外医学:生物医学工程分册*, 2003, 26(3):108-112.
- [23] 钱栋, 马鹏, 李阳, 等. 骨形成蛋白-2结合纤维连接蛋白体外诱导骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞的观察 [J]. *江苏大学学报:医学版*, 2009, 19(2):117-120.
- [24] Romanello M, Moro L, Pirulli D, et al. Effects of cAMP on intercellular coupling and osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;282(5):1138-1144.
- [25] Kantola AK, Keski-Oja J, Koli K. Fibronectin and heparin binding domains of latent TGF- β binding protein (LTBP)-4 mediate matrix targeting and cell adhesion. *Exp Cell Res*. 2008;314(13):2488-2500.
- [26] Li Z, Zhou Z, Saunders MM, et al. Modulation of connexin43 alters expression of osteoblastic differentiation markers. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290(4):C1248-1255.
- [27] Batra N, Kar R, Jiang JX. Gap junctions and hemichannels in signal transmission, function and development of bone. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1818(8):1909-1918.
- [28] Stains JP, Watkins MP, Grimston SK, et al. Molecular Mechanisms of Osteoblast/ Osteocyte Regulation by Connexin43. *Calcif Tissue Int*. 2014;94(1):55-67.
- [29] Watkins M, Grimston SK, Norris JY, et al. Osteoblast connexin43 modulates skeletal architecture by regulating both arms of bone remodeling. *Mol Biol Cell*. 2011;22(8): 1240-1251.
- [30] Zappitelli T, Chen F, Moreno L, et al. The G60S connexin 43 mutation activates the osteoblast lineage and results in a resorption-stimulating bone matrix and abrogation of old-age-related bone loss. *J Bone Miner Res*. 2013;28(11): 2400-2413.
- [31] Lloyd SA, Loiselle AE, Zhang Y, et al. Connexin 43 deficiency desensitizes bone to the effects of mechanical unloading through modulation of both arms of bone remodeling. *Bone*. 2013;57(1):76-83.
- [32] 吕海宏, 李茂欣, 王存福, 等. 去卵巢大鼠骨细胞中间隙连接蛋白43表达的研究 [J]. *中国老年学杂志*, 2004, 24(2):151-153.
- [33] Kar R, Riquelme MA, Werner S, et al. Connexin 43 channels protect osteocytes against oxidative stress-induced cell death. *J Bone Miner Res*. 2013;28(7):1611-1621.
- [34] Li X, Liu C, Li P, et al. Connexin 43 is a potential regulator in fluid shear stress-induced signal transduction in osteocytes. *J Orthop Res*. 2013;31(12):1959-1965.
- [35] Niger C, Lucioti MA, Buo AM, et al. The regulation of runt-related transcription factor 2 by fibroblast growth factor-2 and connexin43 requires the inositol polyphosphate/protein kinase C δ cascade. *J Bone Miner Res*. 2013;28(6): 1468-1477.
- [36] He J, Zhou W, Zhou X, et al. The anatase phase of nanotopography titania plays an important role on osteoblast cell morphology and proliferation. *J Mater Sci Mater Med*. 2008; 19(11):3465-3472.